

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A  
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR  
JEAN LESSARD

EFFET DES IONS MONOVALENTS SUR LA  
CONSTANTE DIELECTRIQUE DE L'INTERFACE  
TETE POLAIRE/CHAINES CARBONEES DES  
VESICULES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RESUME

L'effet des ions monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) sur la constante diélectrique ( $\epsilon$ ) des vésicules de phosphatidylcholine (PC) / Alpha-tocophérol ( $\alpha\text{t}$ ) a été étudié à l'aide de la réaction entre le diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) et  $\alpha\text{t}$ . Les résultats montrent que les ions modifient la constante diélectrique de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées des vésicules de PC- $\alpha\text{t}$ . L'ion montrant l'effet le plus prononcé étant le  $\text{K}^+$  suivi du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Li}^+$  respectivement. Cette série va à l'inverse de la situation observée dans des solutions aqueuses (Hasted et al. 1948). Deux hypothèses ont été amenées pour expliquer l'effet de la concentration des ions monovalents sur la polarité: d'abord, l'effet de "Salting Out" qui consiste en une déshydratation de l'interface, puis une autre, la saturation diélectrique qui consiste en une réorientation des dipôles des molécules d'eau.

En ce qui concerne cette dernière hypothèse, deux méthodes de calculs ont été utilisées pour évaluer la densité des charges de surface  $\sigma$ , c'est-à-dire, la méthode d'Altenbach-Seeling et celle de Gouy-Chapman. La comparaison de ces deux méthodes suggère la possibilité d'une variation de la taille des vésicules en fonction de la force ionique. L'effet de la taille des ions hydratés pourrait s'expliquer par une différence de perméabilité des ions à l'intérieur de l'interface suggérant ainsi une certaine sélectivité des vésicules de PC- $\alpha\text{t}$ . Ces résultats peuvent avoir des conséquences importantes au niveau des phénomènes biologiques particulièrement en ce qui a trait aux réactions de transfert d'électrons.

AVANT-PROPOS

La rédaction d'un rapport de recherche n'est pas toujours perçue comme l'étape la plus stimulante des études graduées. Cependant, c'est un exercice nécessaire qui permet à l'auteur de prendre un recul face à son travail et d'en faire ressortir l'essentiel. J'ose espérer que ce mémoire saura donner aux lecteurs un compte-rendu aussi concis que possible de mes travaux.

Il est évident que ce projet n'aurait pu être mené à terme sans l'appui de mon directeur de thèse M. Mário Fragata. Sa grande disponibilité et l'intérêt constant qu'il a maintenu au cours de cette étude ont été d'une grande utilité et je l'en remercie. J'aimerais également remercier M. François Bellemare pour le soutien et l'intérêt envers ce projet. Son sens critique et le support technique qu'il m'a fournis ont été une précieuse collaboration.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	p. ii
AVANT-PROPOS.....	p. iii
TABLE DES MATIERES.....	p. iv
LISTE DES TABLEAUX.....	p. vii
LISTE DES FIGURES.....	p. viii
<u>CHAPITRE I: INTRODUCTION</u> .....	p. 1
I.1. Importance de la constante diélectrique dans les phénomènes biologiques.....	p. 1
I.2. Effets des ions monovalents sur la constante diélectrique des solutions aqueuses.....	p. 4
I.3. Effets ioniques au niveau des interfaces eau-lipides.....	p. 5
I.4. Définition des objectifs.....	p. 10
<u>CHAPITRE II: METHODES EXPERIMENTALES</u> .....	p. 12
II.1. Préparation des vésicules de Phosphatidylcholine.....	p. 12
II.2. Purification des sels utilisés.....	p. 17

II.3. Détermination des cinétiques.....	p. 19
II.3.1. Mélanges éthanol/eau.....	p. 19
II.3.2. Mélanges dioxanne/tampon tris-HCl 61% V/V.....	p. 19
II.3.3. Vésicules de PC.....	p. 20

### CHAPITRE III: DETERMINATION DE LA CONSTANTE DIELECTRIQUE DE

<u>L'INTERFACE EAU/LIPIDE.....</u>	p. 21
III.1. Caractérisation des vésicules de PC- <del>dt</del> .....	p. 21
III.2. Effet de la concentration initiale de DPPH sur la cinétique de réaction.....	p. 21
III.2.1. Mélanges éthanol/eau.....	p. 21
III.2.2. Vésicules de PC- <del>dt</del> .....	p. 26
III.3. Effet de polarité sur la réaction DPPH- <del>dt</del> .....	p. 34
III.4. Discussion.....	p. 38

### CHAPITRE IV: EFFETS DES IONS MONOVALENTS SUR LA CONSTANTE DIELECTRIQUE

<u>DE L'INTERFACE EAU/LIPIDE.....</u>	p. 39
IV.1. Effet de la force ionique sur la réaction DPPH- <del>dt</del> .....	p. 39
IV.2. Effet de la force ionique sur la constante diélectrique des vésicules de PC.....	p. 40
IV.3. Effet "Salting Out".....	p. 52

IV.4. Champ électrique au voisinage des surfaces membranaires.....	p. 58
IV.4.1. Calcul de $\sigma$ avec l'équation de Altenbach et Seelig..	p. 59
IV.4.2. Calcul de $\sigma$ avec l'équation de Gouy-Chapman.....	p. 67
IV.4.3. Effet du champ électrique sur la polarité de l'interface.....	p. 69
IV.5. Effet de la taille de l'ion hydraté.....	p. 75
IV.6. Discussion.....	p. 79
 <u>CHAPITRE V: CONCLUSION GENERALE</u> .....	p. 80
 BIBLIOGRAPHIE.....	p. 82

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Analyse des chaînes hydrocarbonnées de la phosphatidylcholine (PC) de jaunes d'oeufs.....	p. 13
Tableau 2: Valeurs de $K'$ et $[DPPH]$ pour différents mélanges éthanol/eau.....	p. 27
Tableau 3: Valeurs de $K'$ en fonction de $[NaCl]$ dans les mélanges dioxanne/tampon tris-HCL 61% V/V.....	p. 41
Tableau 4: Valeur de $K'$ en fonction de la concentration et de la taille des ions monovalents.....	p. 46
Tableau 5: Valeurs des constantes diélectriques à l'interface eau/ lipides.....	p. 50
Tableau 6: Valeurs de la concentration effective de KCl en fonction de la constante diélectrique de l'interface.....	p. 66
Tableau 7: Valeurs de $\sigma$ et E calculées par la méthode de Altenbach et Seelig.....	p. 68
Tableau 8: Valeurs de $\sigma$ et E calculées par la théorie de Gouy-Chapman.....	p. 70



## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique d'une vésicule de phosphatidylcholine.....	p. 6
Figure 2: Préparation des vésicules de PC- $\alpha$ t.....	p. 14
Figure 3: Tension de surface des solutions salines.....	p. 18
Figure 4: Profil d'élution des vésicules après fractionnement sur sépharose-4B.....	p. 22
Figure 5: Variation de l'absorbance en fonction du temps pour deux concentrations initiales de DPPH dans 93% éthanol/eau....	p. 24
Figure 6: Graphique de $\ln[(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})]$ en fonction du temps pour deux concentrations initiales de DPPH dans 93% éthanol/eau.....	p. 25
Figure 7: Variation du $K'$ avec $[DPPH]_i$ dans différents mélanges éthanol/eau.....	p. 28
Figure 8: Variation de l'absorbance en fonction du temps pour deux concentrations initiales de DPPH dans les vésicules de PC- $\alpha$ t 0,05 M NaCl.....	p. 29

Figure 9: Graphique de $\ln[(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})]$ en fonction du temps pour deux concentrations initiales de DPPH dans les vésicules de PC- $\alpha$ t 0,05 M NaCl.....	p. 31
Figure 10: Variation de $K'$ avec $[DPPH]_i$ dans les vésicules de PC- t, 0,4 M KCl.....	p. 32
Figure 11: Graphique de $\ln K$ en fonction de $[(\epsilon - 1) / (2\epsilon + 1)]$ .....	p. 36
Figure 12: Variation de $K'$ en fonction de $[NaCl]$ dans les vésicules de PC- $\alpha$ t et dans des mélanges dioxanne/tampon tris-HCl 61% V/V.....	p. 42
Figure 13: Variation de $K'$ en fonction de $[KCl]$ dans les vésicules de PC- $\alpha$ t.....	p. 44
Figure 14: Variation de $K'$ en fonction de $[LiCl]$ dans les vésicules de PC- $\alpha$ t.....	p. 45
Figure 15: Variation de $\epsilon$ en fonction de la concentration de KCl, NaCl et LiCl dans les vésicules de PC- $\alpha$ t.....	p. 48
Figure 16: Hypothèse du "Salting Out".....	p. 55
Figure 17: Variation de $K'$ en fonction de $[Sel]^{1/2}$ dans les vésicules de PC- $\alpha$ t.....	p. 57

Figure 18: Variation de  $\log k_{\text{obs}}$  en fonction de  $1/\epsilon$ ..... p. 63

Figure 19: Hypothèse des paires d'ions..... p. 74

Figure 20: Variation de  $\epsilon$  en fonction de la concentration de KCl,  
NaCl et LiCl en solution aqueuse..... p. 76

## CHAPITRE I: INTRODUCTION

### I.1. Importance de la constante diélectrique dans les phénomènes biologiques.

La constante diélectrique ( $\epsilon$ ) joue un rôle important dans les divers phénomènes qui se produisent dans les systèmes biologiques. Son influence entre autre sur les systèmes de type biochimique a d'ailleurs fait très tôt l'objet d'une revue (Cohn 1936). Un des aspects qui convient de faire remarquer est l'influence de  $\epsilon$  sur le rendement des réactions de transfert d'électrons. Ces réactions présentent un intérêt majeur, en particulier à cause de leur rôle dans les phénomènes d'oxydation-réduction biologique (photosynthèse, chaîne respiratoire).

Des études faites sur des porphyrines (Ballard et Mauzerall 1980) en solution montrent que le rendement de ces réactions dépend de la polarité du solvant utilisé. D'autres travaux (Veerman et al. 1982) ont confirmé qu'une telle dépendance existait pour la réaction entre le cytochrome c et le cytochrome aa<sub>3</sub>. Il en va de même pour la réaction d'oxydation du ferrocytochrome c avec le ferricyanure de potassium (Fragata et Bellemare 1982, 1983). Finalement, des études effectuées sur la réaction, à l'interface eau-lipide, d'un dérivé chargé de la chlorophylle en réaction avec du ferricyanure (Losev et Mauzerall 1983) montrent que le transfert d'électrons entre ces deux espèces dépend de la position du dérivé de chlorophylle à l'intérieur de la bicouche lipidique. Lorsque le dérivé se trouve plus près de la région polaire de la membrane, la réaction de

transfert d'électrons est plus rapide.

Ces réactions ne sont toutefois pas les seuls phénomènes biologiques qui sont sensibles à la polarité. Par exemple, on peut expliquer le flux de protons dans la mitochondrie en fonction de la concentration de 5,6-dichloro-2-trifluorométhylbenzimidazole par une variation de la constante diélectrique de la membrane (Dilger et McLaughlin 1979). D'ailleurs des travaux récents (Mironov 1983) suggèrent que l'augmentation de constante diélectrique provoquée par la présence de protéines dans les membranes favoriserait le processus de transport ionique à travers ces systèmes. Remarquons que les protéines sont reconnues comme étant des molécules possédant une constante diélectrique élevée (Rees 1980).

La polarité influence également la dissociation des espèces chimiques présentes à la surface des membranes. On a observé que le  $pK_a$  d'acides gras et d'amines à longues chaînes variait selon la polarité du milieu où ces substances sont incorporées (Ptak et al. 1980). Finalement, la constante diélectrique va affecter la capacitance et les propriétés électriques des membranes (Ashcroft et al. 1980). Elle peut également influencer les valeurs de champs électriques locaux et de potentiels à l'intérieur de la membrane (Duniec et Thorne 1981, 1983).

Nous nous intéressons dans ce travail aux mécanismes qui sont à l'origine des variations de polarité à l'interface eau-lipide des bicouches lipidiques. Nous verrons dans ce qui suit que cela est en partie possible par le truchement de la variation des concentrations ioniques

interfaciales.

## I.2. Effets des ions monovalents sur la constante diélectrique des solutions aqueuses.

Les ions monovalents ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) modifient la constante diélectrique des solutions aqueuses (Hasted et al. 1948). Il a en effet été montré que  $\epsilon$  diminue lorsque la concentration en espèces ioniques de la solution augmente. Ce phénomène s'explique par l'orientation des dipôles des molécules d'eau au voisinage d'un ion (Hasted et Ritson 1948). Par exemple lorsqu'une molécule d'eau est située à une distance en deçà de  $4 \text{ \AA}$  d'un ion positif, la constante diélectrique associée à cette même molécule d'eau passe de 78 à 4 ou 6. Ce phénomène est appelé saturation diélectrique et son traitement théorique a été bien décrit par quelques auteurs (Hasted 1973, Pottel 1973).

Il est à noter ici que l'effet de saturation diélectrique varie avec la taille de l'ion hydraté impliqué dans le phénomène. Les résultats obtenus par Hasted et al. (1948) montrent que pour une concentration équivalente de sel, la valeur  $\epsilon$  d'une solution de  $\text{LiCl}$  est plus faible que celle observée avec le  $\text{KCl}$ . Ceci est confirmé par d'autres travaux (Pottel 1973) où l'on montre clairement que l'effet d'un ion plus hydraté ( $\text{Li}^+$ ) est nettement plus grand que celui d'un ion possédant un rayon d'hydratation plus faible ( $\text{Na}^+$ ).

### I.3. Effets ioniques au niveau des interfaces eau-lipides.

Le modèle que nous utiliserons au cours de cette étude pour reproduire artificiellement la biomembrane sera celui des vésicules lipidiques unilamellaires contenant de la phosphatidylcholine (PC). La méthode de préparation d'un tel système est généralement assez simple et nous permet d'y incorporer différentes sondes afin de pouvoir étudier avec une bonne précision certaines propriétés physico-chimiques. Il nous est d'ailleurs possible de contrôler le taux d'incorporation de la sonde moléculaire et de minimiser ainsi toute perturbation du système initial.

Tout comme les membranes naturelles, les vésicules unilamellaires sont formées d'une bicouche lipidique. Ce type de structure est rendu possible à cause du caractère amphiphile des phospholipides utilisés. En effet, ces molécules possèdent une partie soluble dans l'eau, dite polaire, et une autre partie non-miscible avec l'eau que l'on nomme hydrophobe. Lorsque ces molécules sont dispersées dans l'eau, elles ont tendance à former des micro-gouttelettes. Les lipides à une seule chaîne s'assemblent généralement sous forme de micelles, alors que les lipides à deux chaînes forment plutôt des vésicules uni- ou multilamellaires. Un des principes importants qui régit la formation de ces structures est celui des forces opposées (Tanford 1980), selon lequel les parties polaires sont soumises à une force de répulsion de type électrostatique, alors que les chaînes hydrophobes subissent une attraction de type Van Der Waals (Israëlichvili 1977). La figure 1 nous montre une vue schématique d'une vésicule formée de phosphatidylcholine, un des lipides principaux des membranes



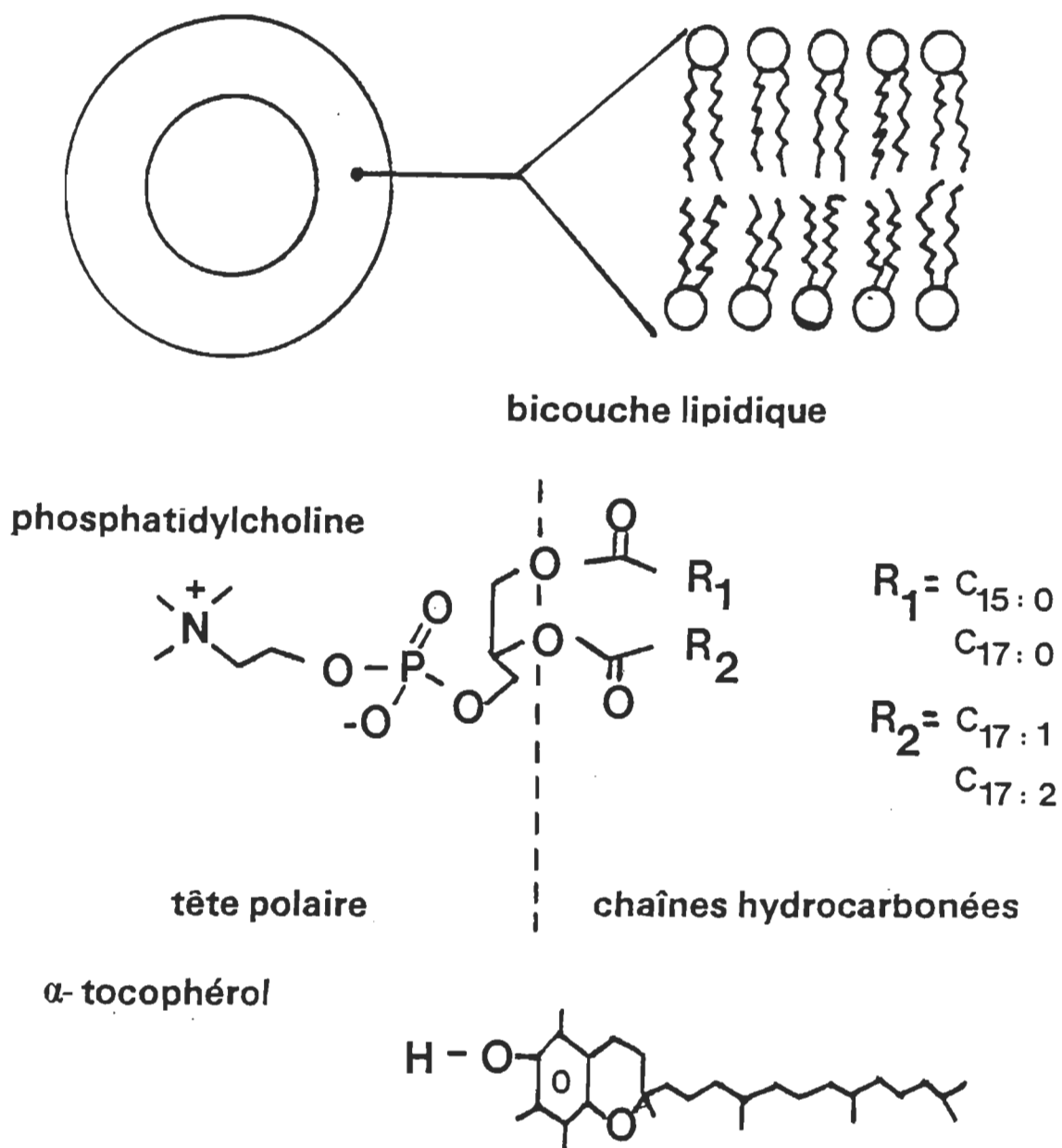


Figure 1. Représentation schématique d'une vésicule de phosphatidylcholine (PC). On donne aussi la structure chimique de  $\alpha$ -tocophérol, la sonde qui a été incorporée dans les vésicules de PC.

naturelles. Les dimensions données pour ces vésicules diffèrent d'un auteur à l'autre, bien que ces variations soient assez faibles. Les valeurs de rayons externes, par exemple, se situent généralement aux environs de 102 Å (Johnson 1973) à 105 Å (Huang et Mason 1978), mais elles peuvent être plus élevées soit e.g. 109 Å (Chrzeszczyk et al. 1977). La région des vésicules qui nous intéresse dans ce travail est l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées. Cette région constitue une zone de transition entre le milieu polaire et le milieu hydrophobe. Il a été montré que cette interface possédait des propriétés électriques différentes de celles des autres régions de la bicouche lipidique (Ashcroft et al. 1980), les valeurs de capacitance et de résistance étant intermédiaires entre celles de la région polaire et de la zone hydrophobique (Laver et al. 1983). Cela nous amène dans l'étude qui suit à caractériser davantage cette région afin de mieux comprendre le rôle de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées dans les phénomènes membranaires.

La présence d'espèces ioniques dans la solution aqueuse entourant une couche bilipidique peut altérer ou modifier les interactions entre les lipides. Il a été montré que les ions divalents ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ) peuvent s'adsorber sur la phosphatidylcholine (McLaughlin et al. 1978) et que cette adsorption peut être décrite par l'équation de Stern. On sait aussi que ces mêmes ions peuvent interagir avec la phosphatidylsérine (Nir et al. 1978). Ce phénomène n'est toutefois pas limité aux ions divalents. Les ions monovalents ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) s'adsorbent également sur des vésicules formées de phosphatidylsérine (Eisenberg et al. 1979). Cette

fois, l'adsorption est décrite par une combinaison de la théorie de Gouy et de l'isotherme de Langmuir. Le  $\text{Na}^+$  peut aussi affecter l'interaction du  $\text{Mn}^{+2}$  avec la phosphatidylsérine (Puski et Coene 1980), et également l'adsorption du  $\text{Ca}^{+2}$  sur la phosphatidylcholine (Akutsu et Seelig 1981), ce qui montre qu'un effet compétitif existe entre les ions monovalents et divalents. Ceci laisse supposer l'existence de sites spécifiques d'adsorption pour les ions sur les vésicules (Kurland et al. 1979).

Certaines études ont été menées dans le but de préciser l'effet de l'interaction des ions monovalents avec les vésicules de phospholipides (Hauser et Shipley 1983). Ces travaux démontrent, par exemple, que le  $\text{Li}^+$  induit la cristallisation des chaînes hydrocarbonées des lipides. Les ions monovalents peuvent également modifier la température de transition des systèmes lipidiques (Träuble et al. 1976) mimant ainsi l'effet du pH. Ceci va évidemment affecter la fluidité de ces membranes (Eibl 1983). De telles modifications peuvent avoir d'importantes conséquences au niveau biologique.

On observe également un effet des ions monovalents sur l'orientation du groupement polaire par rapport au plan de la bicouche (Soderman et al. 1983). Cet effet est aussi obtenu avec les ions divalents et trivalents (Akutsu et Seelig 1981). Les ions monovalents vont également affecter les forces de répulsion entre les bicouches formées de lipides neutres (Parsegian et al. 1979) et chargés négativement (Loosley-Millan et al. 1982). La présence d'espèces ioniques telles le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$  va réduire les forces de répulsion nette et les forces de van der Waals agissant

entre les vésicules (Afzal et al. 1984). En outre, vu que les ions monovalents peuvent interagir avec les lipides et modifier ainsi la structure des vésicules, il est donc vraisemblable que ces ions puissent affecter la polarité des systèmes membranaires. Certains auteurs ont d'ailleurs suggéré que la constante diélectrique de l'eau au voisinage de la membrane est inférieur à celle de l'eau libre dans la solution environnante (Wang et Bruner 1977, Bruner 1978).

#### I.4. Définition des objectifs.

Nous avons vu plus haut que la constante diélectrique des bicouches lipidiques a des conséquences importantes sur la réaction de transfert d'électrons entre les molécules présentes dans ces systèmes. D'autre part, il ressort de notre discussion que les ions monovalents modifient la constante diélectrique de l'eau. Etant donné que ces ions sont présents dans les systèmes biologiques et peuvent interagir avec les lipides membranaires et l'eau interfaciale, nous nous proposons d'étudier l'effet des ions  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sur la constante diélectrique de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées des vésicules de phosphatidylcholine. Notre objectif est de vérifier, d'une part, si ces ions modifient la polarité de l'interface, et d'étudier d'autre part, le rôle que joue la taille de l'ion hydraté dans le contrôle de la polarité de l'interface.

Afin de déterminer la polarité à l'interface eau-lipide, nous incorporerons de l'alpha-tocophérol ( $\alpha\text{t}$ ) à un rapport molaire initial de 5%  $\alpha\text{t}/\text{PC}$  dans les vésicules de PC. L'étude de l'incorporation de l'alpha-tocophérol dans la PC a montré qu'à cette concentration relative on obtient un taux d'incorporation finale de 1%  $\alpha\text{t}/\text{PC}$  (Bellemare et Fragata 1980). Ce taux de dilution de l' $\alpha\text{t}$  dans la membrane minimise les interactions possibles entre des molécules de  $\alpha\text{t}$ . Il est à noter, d'autre part, que des travaux divers établissent la position de la tête polaire de l'alpha-tocophérol près de l'interface eau-lipide en formant un lien hydrogène soit avec un des groupes carbonyl des chaînes carbonées (Cushley et Forrest 1977), soit avec un des oxygènes du groupement phosphate

(Srivasta et al. 1983). Ces deux conditions sont essentielles pour mener à bien des mesures de polarité (voir Fragata et Bellemare 1980).

La constante de vitesse de réaction entre le tocophérol et un radical libre, le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), nous servira d'indice pour évaluer la polarité. Cette réaction a été bien étudiée précédemment (Bellemare et Fragata 1980, Boguth 1969) et sa grande dépendance sur la polarité du milieu en fait un moyen efficace pour obtenir des valeurs de constantes diélectriques dans les bicouches lipidiques. Ces dernières seront d'ailleurs obtenues en comparant les constantes de vitesse de la réaction DPPH- $\alpha$ t mesurées dans les vésicules avec celles obtenues dans des solvants de polarité différentes (voir plus loin). Ceci peut être fait en utilisant des mélanges éthanol/eau contenant différentes quantités d'eau.

Ainsi en variant la force ionique de la solution aqueuse contenant les vésicules de PC incorporant l' $\alpha$ -t, il nous sera possible d'étudier l'effet de la concentration des ions ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) sur la constante diélectrique du système. Nous étudierons principalement l'effet du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$  à cause de leur importance biologique. Nous ajouterons à cela l'étude de l'effet du  $\text{Li}^+$  afin d'avoir une gamme plus vaste de résultats concernant l'effet de la taille des ions hydratés.

## CHAPITRE II: METHODES EXPERIMENTALES

### II.1. Préparation des vésicules de phosphatitylcholine.

La phosphatitylcholine (PC) est extraite de jaunes d'oeufs à l'aide de la méthode de Singleton et al. (1965) que nous avons légèrement modifiée pour les besoins de cette étude. Environ 500g de jaunes d'oeufs sont précipités à l'acétone puis le résidu solide est dissout dans l'éthanol. On répète cette étape jusqu'à disparition de la pigmentation jaune des oeufs. On précipite à l'acétone, on centrifuge puis on dissout le résidu dans le chloroforme. On purifie la phosphatitylcholine sur une colonne de gel d'alumine (Sigma chemical Co.) (chloroforme:méthanol 9:1). La pureté est vérifiée par chromatographie sur une couche mince (ccm) de gel de silice (Sigma chemical Co.) (chloroforme:méthanol:eau 65:25:4) en utilisant soit le réactif de Dragendorff ou la vapeur d'iode. La composition des chaînes hydrocarbonées de la PC a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Le tableau 1 nous montre la comparaison entre notre analyse et celles obtenues par d'autres chercheurs (Singleton et al. 1965, Sunamoto et al. 1985).

L'alpha-tocophérol est un produit de Eastman Kodak Co. et sa pureté a été vérifiée sur ccm de silice (Benzène:éthanol 99:1) en se servant de  $K_3Fe(CN)_6$  suivi de  $FeCl_3$  comme révélateurs.

Les vésicules de PC -  $\alpha$ t ont été préparées en suivant une procédure générale décrite par Huang (1969), et par Bellemare et Fragata (1980) que

Tableau 1

Analyse des chaînes hydrocarbonées de la  
Phosphatidylcholine de jaunes d'oeufs.

Chaînes	%(1)	%(2)	%(3)
16:0	37.9	37.7	31.0
16:1	2.1	3.1	1.4
18:0	9.8	9.2	14.4
18:1	34.0	32.9	31.1
18:2	14.0	17.0	14.8
20:4w6	2.2	-	5.5

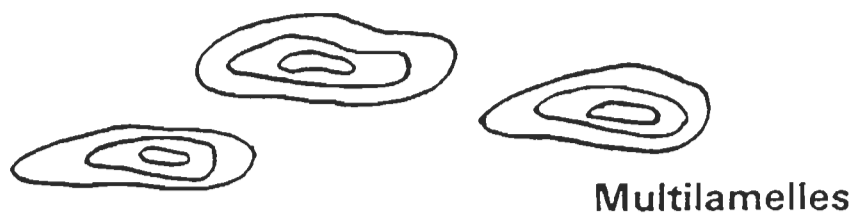
(1) Analyse effectuée par M. Jean-Pierre Richard (C.P.R., U.Q.T.R.) des échantillons de PC de jaunes d'oeufs utilisés dans nos expériences.

(2) Singleton et al. (1965)

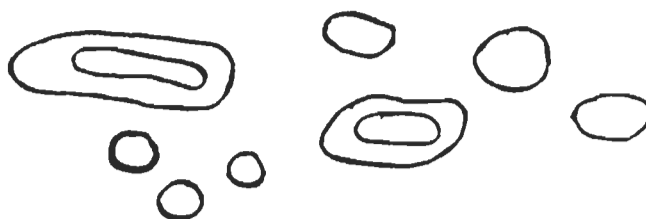
(3) Sunamoto et al. (1985)



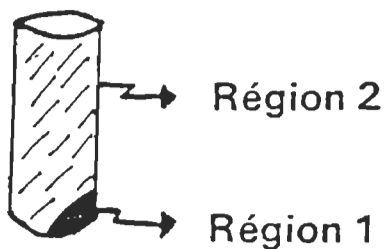
1. Dispersion dans tampon tris-HCl



2. Sonication 15-20 min.



3. Ultracentrifugation 1 Hr 100 000 g



4. Fractionnement sur sepharose 4-B

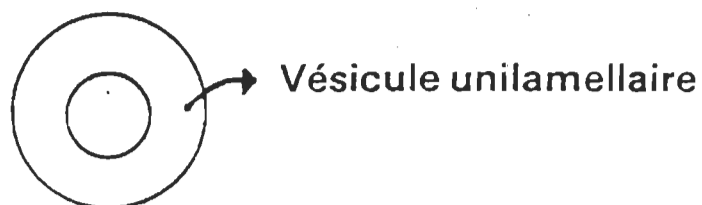


Figure 2. Préparation des vésicules de PC- $\alpha$ t.

nous avons légèrement modifiée afin de l'adapter à notre étude. Cette procédure est schématisée sur la figure 2. Approximativement 150 mg de PC ont été mélangés avec du tocophérol dans du  $\text{CHCl}_3$  (AR grade) dans un rapport molaire de 5%  $\alpha\text{t}/\text{PC}$ . Après évaporation sous azote afin de prévenir l'oxydation des lipides, ceux-ci ont été dispersés dans 10 ml de tampon tris-HCl (0,01 M pH 8,0) contenant la concentration appropriée du sel à étudier. L'eau utilisée dans la préparation de tous les tampons a été déminéralisée puis distillée afin d'obtenir un degré de pureté élevé. Il est important lorsque l'on travaille avec des molécules surfactantes tels les phospholipides d'utiliser une eau très pure.

La suspension lipidique formée dans le tampon a par la suite été soumise à une sonication (Heat systems Ultrasonics, puissance à la sortie 20W) durant 15 à 20 minutes dans une cellule réfrigérée, avec de l'azote barbotant dans la solution. Il est important d'effectuer la sonication à température contrôlée (15°C) et en présence d'un gaz inerte pour éviter la formation de radicaux libres lors de cette étape.

Après une centrifugation de 1 hr à 100 000g pour éliminer le titane résiduel de la sonication et les agrégats de lipides, le surnageant (8 à 9 ml) est concentré à 1 à 2 ml dans une cellule Amicon. Cette étape est rendue nécessaire dans le but de minimiser le volume d'injection sur la colonne de Sépharole 4-B (Pharmacia Fine Chemicals, 2.5 X 60 cm). Après fractionnement sur le gel, on récolte des fractions de 5 à 6 ml qui seront utilisées ultérieurement pour les déterminations de cinétiques. On mesure la densité optique à 300 nm de chaque fraction contenant des vésicules

afin de caractériser celles-ci (voir figure 4).

## II.2. Purification des sels utilisés.

Tous les sels utilisés au cours de cette étude (NaCl, KCl, LiCl) ont été purifiés en les lavant avec trois solvants organiques différents (méthanol, benzène, chloroforme) préalablement distillés dans le verre. Chaque sel a été lavé trois fois avec ces solvants afin d'éliminer les résidus organiques puis séché à l'étuve (150-160°C) pendant 24hrs pour évaporer le solvant restant.

La pureté de chaque sel a été vérifiée en prenant la tension de surface de solutions salines à l'aide d'un tensiomètre à anneau. La figure 3 nous donne un exemple de courbes de tension de surface obtenues avant et après purification de  $\text{NaCl}$ .

On pourra remarquer que la courbe obtenue avec le NaCl purifié diffère quelque peu de celle obtenue à partir de résultats publiés antérieurement (Chemistry and Physics, CRC, 60<sup>e</sup> éd. 1980, F-43). Ceci peut s'expliquer par la différence de tension de surface de l'eau utilisée. Il nous a été impossible en dépit de la purification de l'eau utilisée d'obtenir une tension de surface supérieure à 69,2 dynes/cm. Cependant le fait que notre courbe soit à peu près parallèle à celle de la littérature indique que nous avons abouti à la purification du sel.

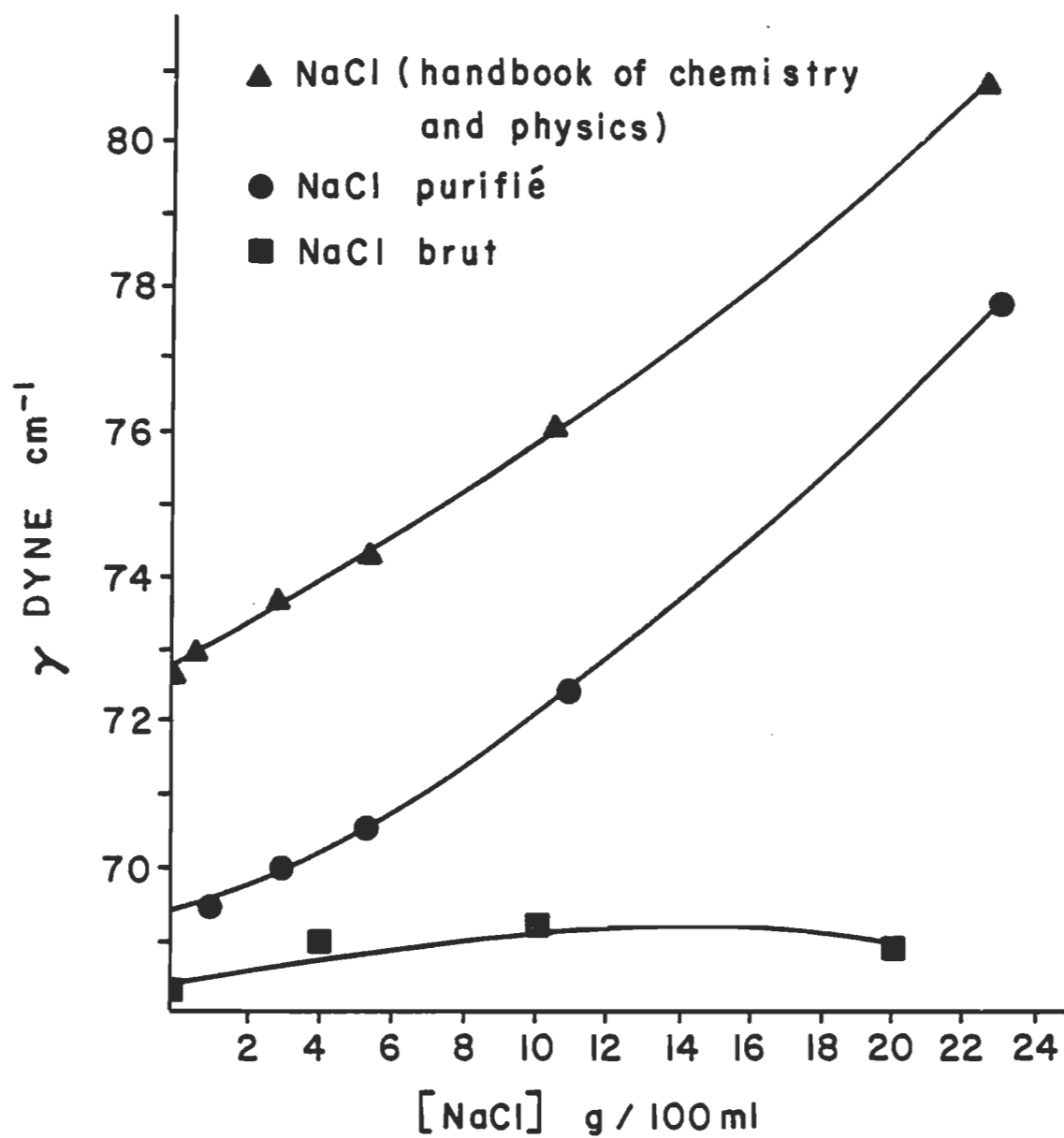


Figure 3. Tensions de surface des solutions salines.

### II.3. Détermination des cinétiques.

#### II.3.1. Mélanges éthanol/eau.

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH, BDH chemicals) utilisé sans purification préalable est dissout dans de l'éthanol (environ 2 mg/ml). Un aliquot précis de cette solution mère est ajouté à des mélanges binaires d'éthanol/eau de respectivement 100, 95, 93, 90, 75% V/V. L'alpha-tocophérol est également dissout dans de l'éthanol (0,2 mg/ml) et 0,1 ml de cette solution est mis en présence de 3 ml du mélange binaire contenant le DPPH. Il est important de s'assurer que la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel est au moins dix fois supérieure à celle de l'alpha-tocophérol.

On suit la réaction entre les deux espèces à 516 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer Fast Scan modèle 553. La pseudo constante de premier ordre de la réaction est calculée à partir des courbes de variation d'absorbance du DPPH puis on calcule la constante de deuxième ordre en mesurant la cinétique à différentes concentrations de DPPH.

#### II.3.2. Mélanges dioxanne/tampon tris-HCl 61% V/V.

Nous avons également étudié la réaction DPPH- $\alpha$ t dans des mélanges dioxanne/tampon tris-HCl 61% V/V afin de mesurer l'effet de force ionique. Le DPPH dissout dans le dioxanne (2mg/ml) est ajouté à un mélange dioxanne/tampon tris-HCl 61% V/V contenant différentes concentrations de

NaCl (0.0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 M). La réaction entre 3 ml de la solution de DPPH résultante (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et 0.1 ml d'une solution d'alpha-tocophérol dans le dioxanne (0.2  $\text{mg}/\text{ml}$ ) est suivie sur un spectrophotomètre à 516 nm. Les pseudo-constantes de premier ordre ont été déterminées pour chaque réaction dans les différents mélanges dioxanne/tampon.

### II.3.3. Vésicules de PC.

Le DPPH est dissout dans de l'éthanol (2  $\text{mg}/\text{ml}$ ) et 0.6 ml de cette solution est ajouté à 100 ml d'un tampon tris-HCl (0,01M pH 8.0) contenant la concentration du sel à étudier. La concentration initiale de cette suspension a été ajustée de façon à obtenir une absorbance de 0,250 à 516 nm afin d'assurer qu'il y ait excès de ce réactif. On suit la réaction entre 3 ml de cette suspension de 350  $\mu\text{l}$  de vésicules (absorbance de 0,300 à 300 nm). Ceci nous assure que la différence d'absorbance du DPPH entre le début et la fin de la réaction est inférieure à 0,07. On étudie la cinétique de réaction pour chaque sel à différentes concentrations puis on calcule les pseudo-constantes de premier ordre et les constantes de deuxième ordre.

Seulement les fractions homogènes de vésicules sont retenues pour les mesures de cinétiques (voir diagramme d'élution, figure 4).

### CHAPITRE III: DETERMINATION DE LA CONSTANTE DIELECTRIQUE DE L'INTERFACE EAU-LIPIDE

#### III.1. Caractérisation des vésicules de PC- $\alpha$ t.

La figure 4 nous montre le diagramme d'élution des vésicules de phosphatidylcholine incorporant l' $\alpha$ -tocophérol après fractionnement sur gel de sépharose 4B.

On distingue trois classes de vésicules sur ce diagramme. Une première (I) qui va des fractions 24 à 32 constituée de grosses vésicules (rayon externe  $> 100 \text{ \AA}$ ) et de multilamelles. Une autre (III) qui va des fractions 42 à 46 formée de vésicules unilamellaires de tailles homogènes (rayon externe de  $102 \text{ à } 120 \text{ \AA}$ ) et, finalement, une région intermédiaire (II) où l'on peut retrouver des vésicules de la région I et de la région III.

#### III.2. Effet de la concentration initiale de DPPH sur la cinétique de réaction.

##### III.2.1. Mélange éthanol/eau.

La cinétique de réaction entre le DPPH et l' $\alpha$ t a d'abord été étudiée dans les mélanges éthanol/eau afin de déterminer l'effet de la concentration initiale de DPPH ( $[DPPH]_i$ ) sur la réaction. Ces résultats serviront ultérieurement pour étudier l'effet de la polarité sur la



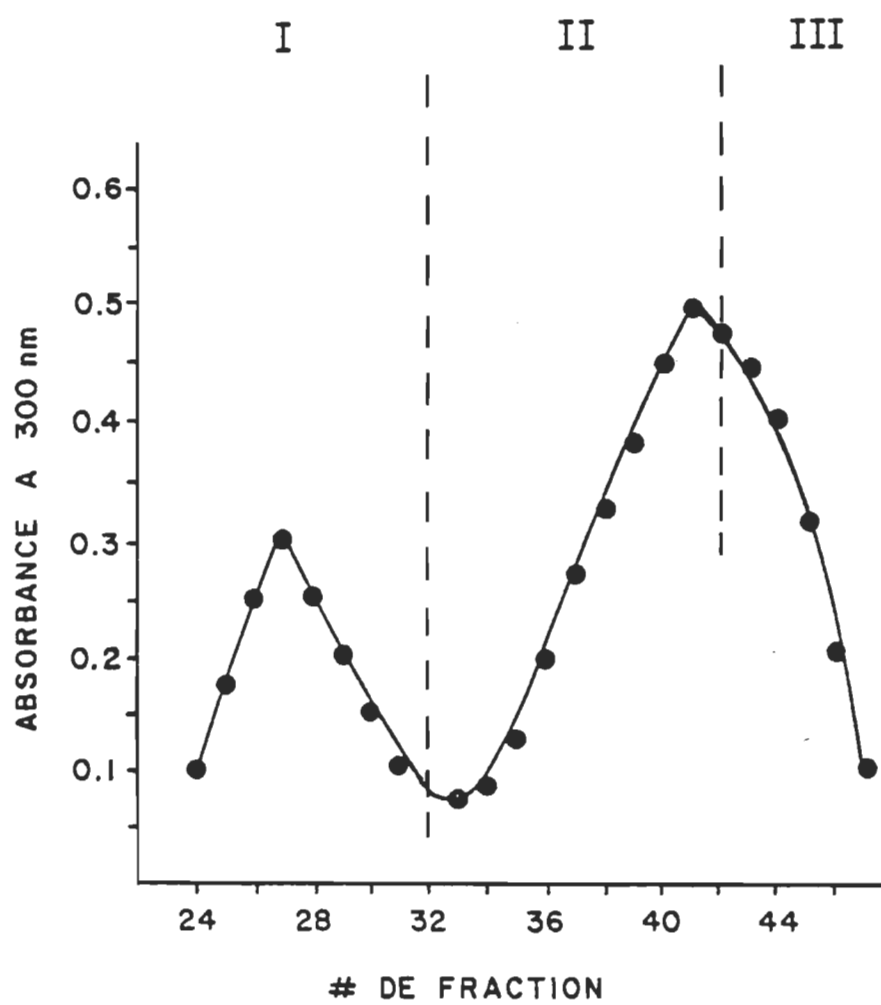


Figure 4. Profil d'élution des vésicules après fractionnement sur sépharose - 4B.

vitesse réactionnelle (voir section 3.3).

La figure 5 nous montre la variation de l'absorbance à 516 nm en fonction du temps pour la réaction DPPH -  $\alpha$ t dans 93% éthanol/eau pour deux concentrations différentes de DPPH. La concentration initiale de l' $\alpha$ -tocophérol dans le mélange réactionnel était de 2  $\mu$ mole/l tandis que celle du DPPH était de 80  $\mu$ mole/l dans le premier cas et de 60  $\mu$ mole/l dans le deuxième cas.

On constate que l'absorbance du mélange diminue plus rapidement en fonction du temps lorsque [DPPH]i est plus élevé. Etant donné que dans les deux cas le DPPH est en excès par rapport à l' $\alpha$ -tocophérol, il est possible de déterminer la pseudo-constante de premier ordre de la réaction à l'aide de la relation suivante (Latham et Burgess 1977):

$$K't = \ln [(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})] \quad (3.1)$$

où  $A_0$  est l'absorbance initiale du mélange,  $A_{\infty}$  l'absorbance finale,  $A_t$  l'absorbance en fonction du temps t, et  $K'$  la pseudo-constante de premier ordre de la réaction.

Un graphique du logarithme naturel du rapport  $[(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})]$  en fonction du temps nous donnera une droite de pente  $K'$  (voir figure 6). Cette figure nous permet de constater que la pseudo-constante de vitesse de la réaction est plus élevée lorsque [DPPH]i est plus grande. La légère inflexion observée dans la courbe aux environs de 42-45 secondes a été

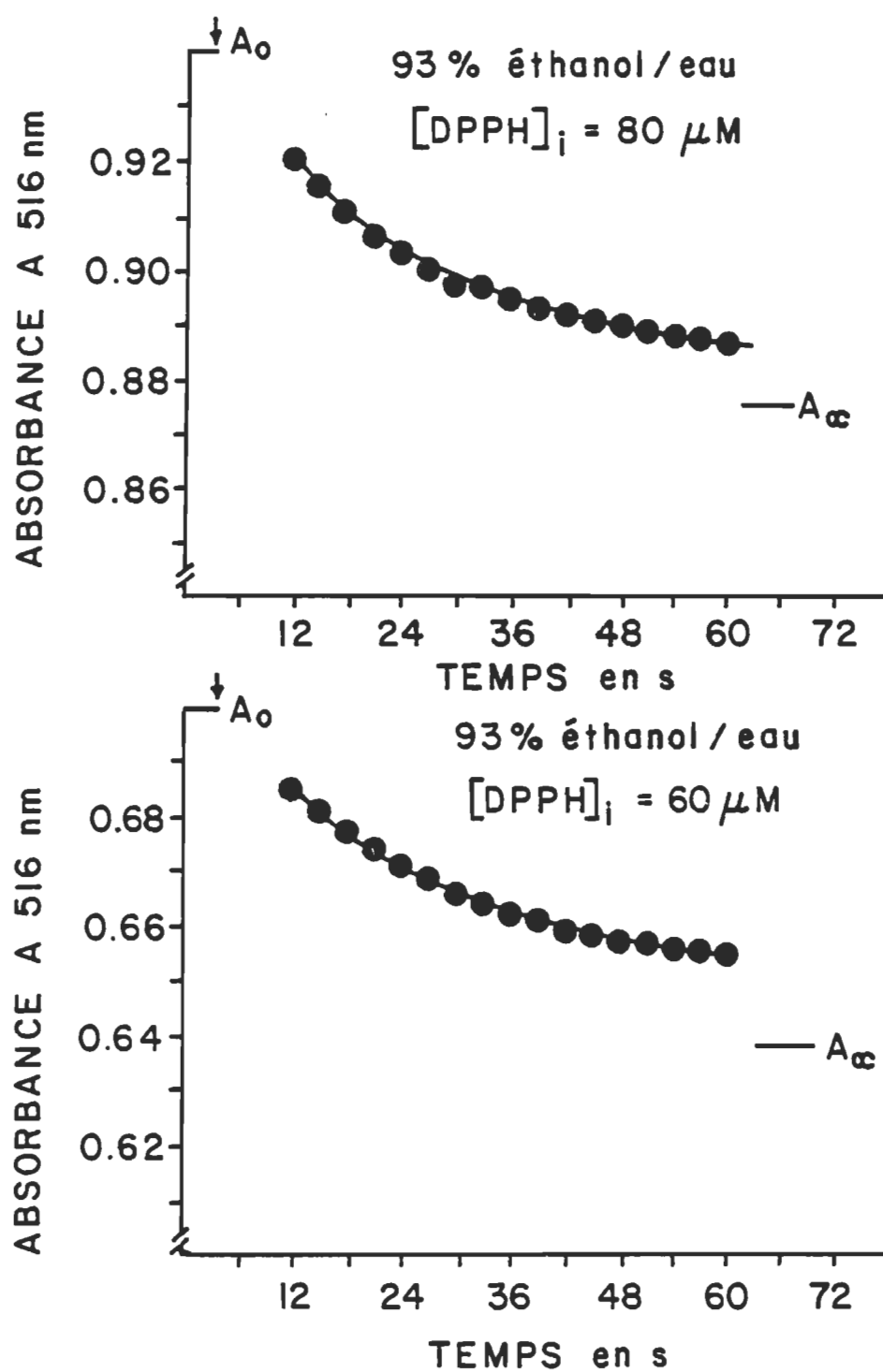


Figure 5. Variation de l'absorbance en fonction du temps pour deux concentrations initiales de DPPH dans 93% éthanol/eau.

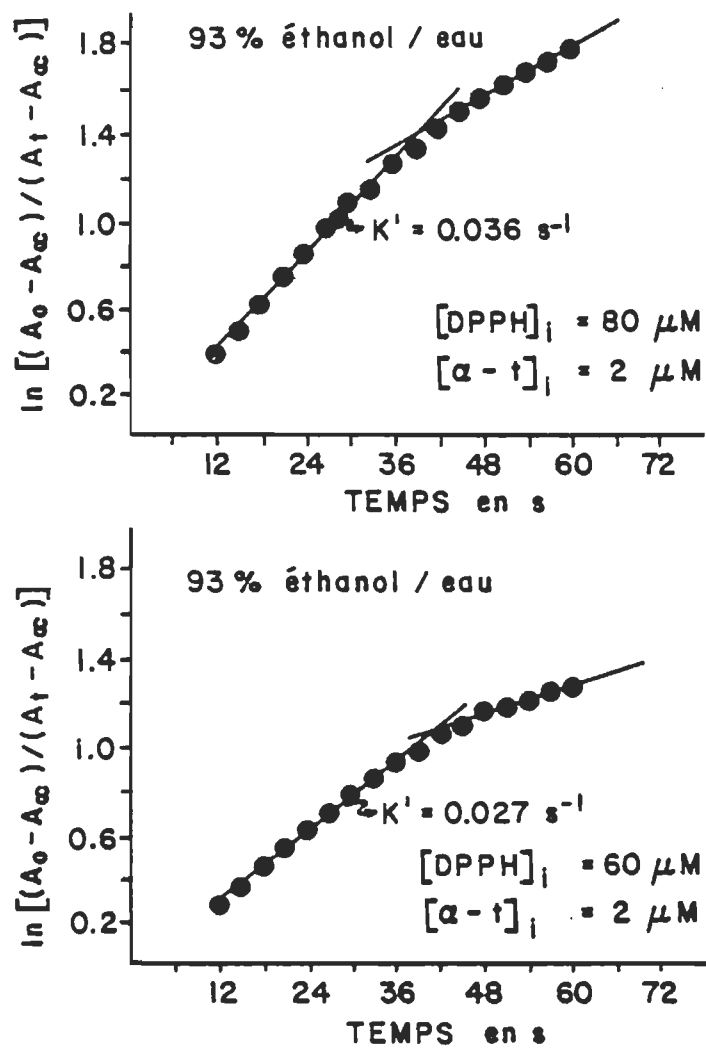


Figure 6. Graphique de  $\ln [(A_0 - A_\infty) / (A_t - A_\infty)]$  en fonction du temps pour deux concentrations initiales de DPPH dans 93% éthanol/eau.

attribuée à une réaction secondaire qui a lieu entre le radical tocophéryl formé et une deuxième molécule de DPPH (Boguth et Nieman 1969), ceci est suivi d'un réarrangement du radical, puis de la formation de dimères et de trimères de tocophérol. Cette inflexion se produit à la moitié de la diminution de l'absorbance soit  $(A_0 - A_{\infty})/2$ .

On peut relier  $K'$  à la constante de deuxième ordre de la réaction DPPH- $\alpha t$  (K) par l'équation:

$$K' = K [\text{DPPH}]_i \quad (3.2)$$

où  $[\text{DPPH}]_i$  est la concentration initiale de DPPH dans le milieu réactionnel. Il est donc possible en traçant le graphique de  $K'$  en fonction de  $[\text{DPPH}]_i$  d'obtenir K. A partir des données du tableau 2, nous avons calculé K pour chacun des mélanges éthanol/eau.

La figure 7 nous montre la variation de  $K'$  avec la concentration initiale de DPPH dans différents mélanges éthanol/eau. La pente de chacune des droites nous donne la valeur K pour chaque réaction. L'augmentation de K avec la concentration d'eau du mélange sera analysé dans la section III.3.

### III.2.2. Vésicules de PC- $\alpha t$

Nous avons également mesuré l'effet de la concentration initiale de

Tableau 2  
Valeurs de  $K'$  et  $[DPPH]_i$  pour  
différents mélanges éthanol/eau

$[DPPH]_i$	100%	95%	93%	90%	75%
M	$K' s^{-1}$	$K' s^{-1}$	$K' s^{-1}$	$K' s^{-1}$	$K' s^{-1}$
30	0,0080	0,0110	0,0130	0,0170	0,0400
35	0,0095	0,0135	0,0150	0,0200	0,0480
50	0,0135	0,0180	0,0215	0,0280	0,0685
80	0,0210	0,0290	0,0350	0,0450	0,1050

$[DPPH]_i$  = concentration initiale de DPPH.

$K'$  = pseudo-constante de premier ordre de réaction.

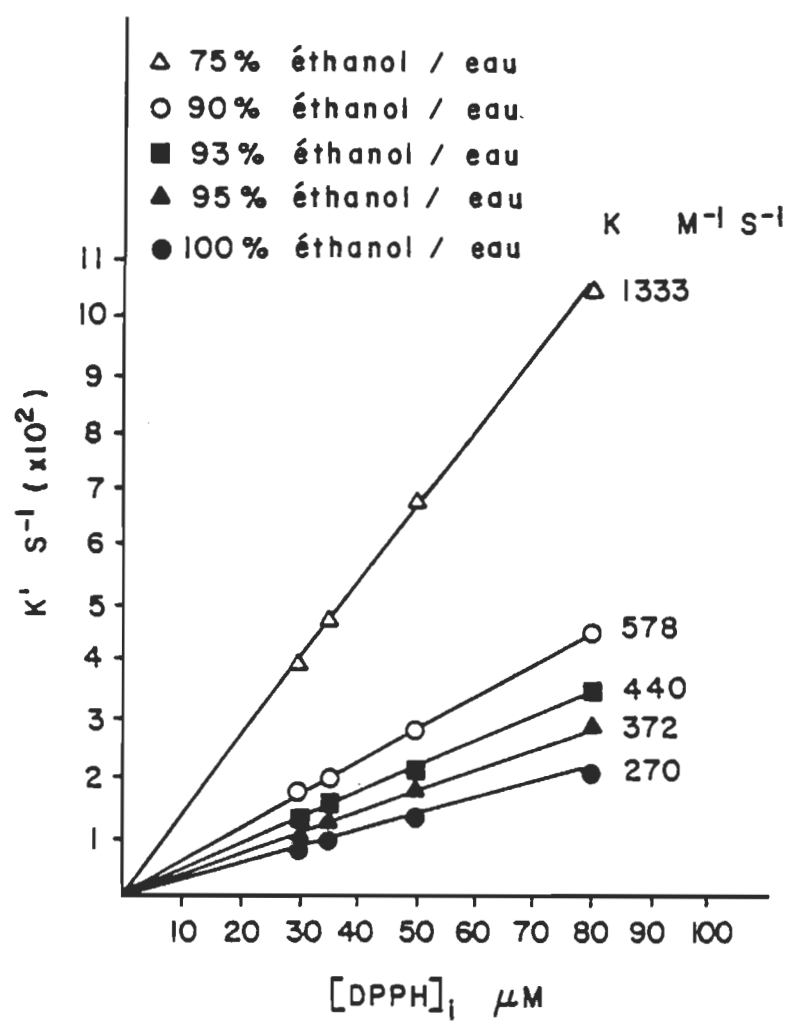


Figure 7. Variation de  $K'$  avec  $[DPPH]_i$  dans différents mélanges éthanol/eau.

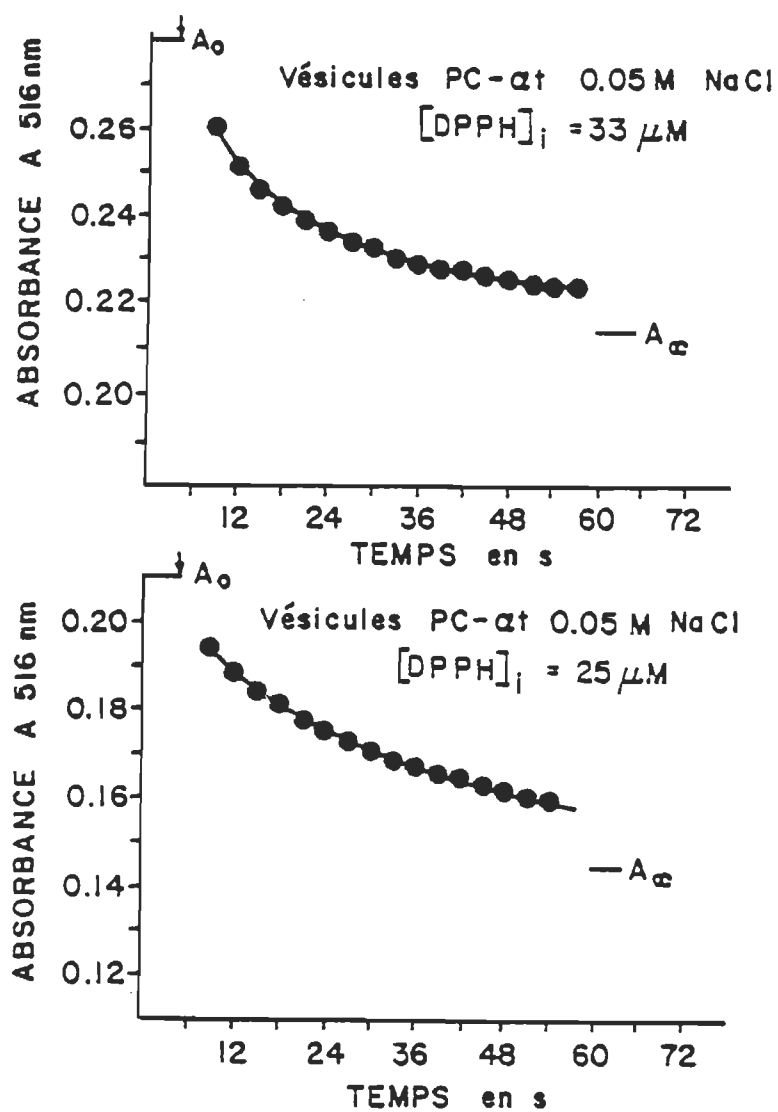


Figure 8. Variations de l'absorbance en fonction du temps pour deux concentrations initiales de DPPH dans les vésicules de PC- $\alpha$ t 0.05M NaCl.



DPPH sur la cinétique de réaction déterminée dans les vésicules de PC- $\alpha$ t. La figure 8 nous montre la variation de l'absorbance du mélange réactionnel en fonction du temps pour deux concentrations différentes de DPPH. On constate que l'absorbance à 516 nm diminue plus rapidement lorsque la concentration de DPPH est plus élevée.

Le graphique de  $\ln [(A_0 - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})]$  en fonction du temps pour deux concentrations de DPPH (figure 9) nous montre à nouveau une inflexion due à la réaction secondaire du DPPH avec le radical tocophéryl formé lors de la première réaction. Cette inflexion correspond à la moitié de la diminution totale de l'absorbance  $(A_0 - A_{\infty})/2$ . La pente de la première droite nous donne la valeur de  $K'$  pour la réaction DPPH- $\alpha$ t mesurée dans les vésicules.

On remarquera cependant que cette droite ne passe pas par l'origine, ceci laisse donc croire qu'une réaction plus rapide aurait lieu dans les dix premières secondes suivant l'addition de DPPH. Le DPPH pourrait par exemple réagir avec des radicaux libres formés lors de la sonication (Pryor 1976). On sait aussi que le DPPH peut réagir avec de l'eau adsorbée sur une surface solide (Misra 1970). On peut donc faire l'hypothèse que l'interface eau-lipide des vésicules unilamellaires de PC agit comme un catalyseur. Ceci pourrait alors favoriser une réaction entre le DPPH et l'eau adsorbée ou éventuellement avec les radicaux libres formés lors de la sonication. Toutefois afin d'élucider cette première réaction, il serait nécessaire d'utiliser un système à injection rapide, notre méthode n'étant pas suffisamment efficace pour mesurer une cinétique de moins de

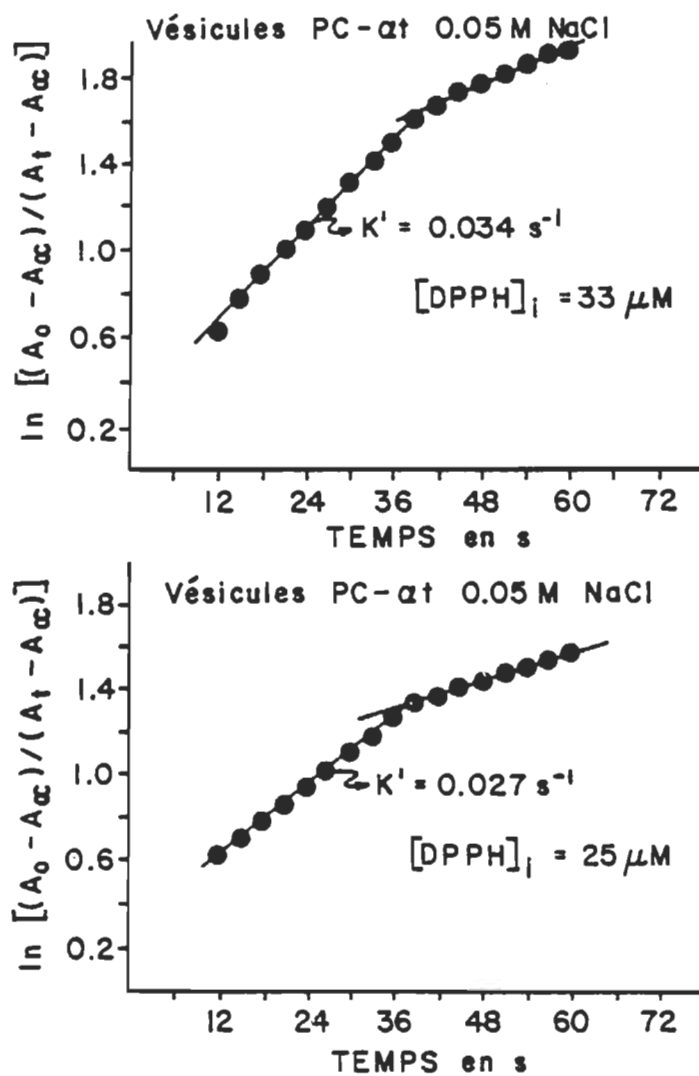


Figure 9. Graphique de  $\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$  en fonction du temps pour deux concentrations initiales de DPPH dans les vésicules de PC- $\alpha$ t 0.05M NaCl.

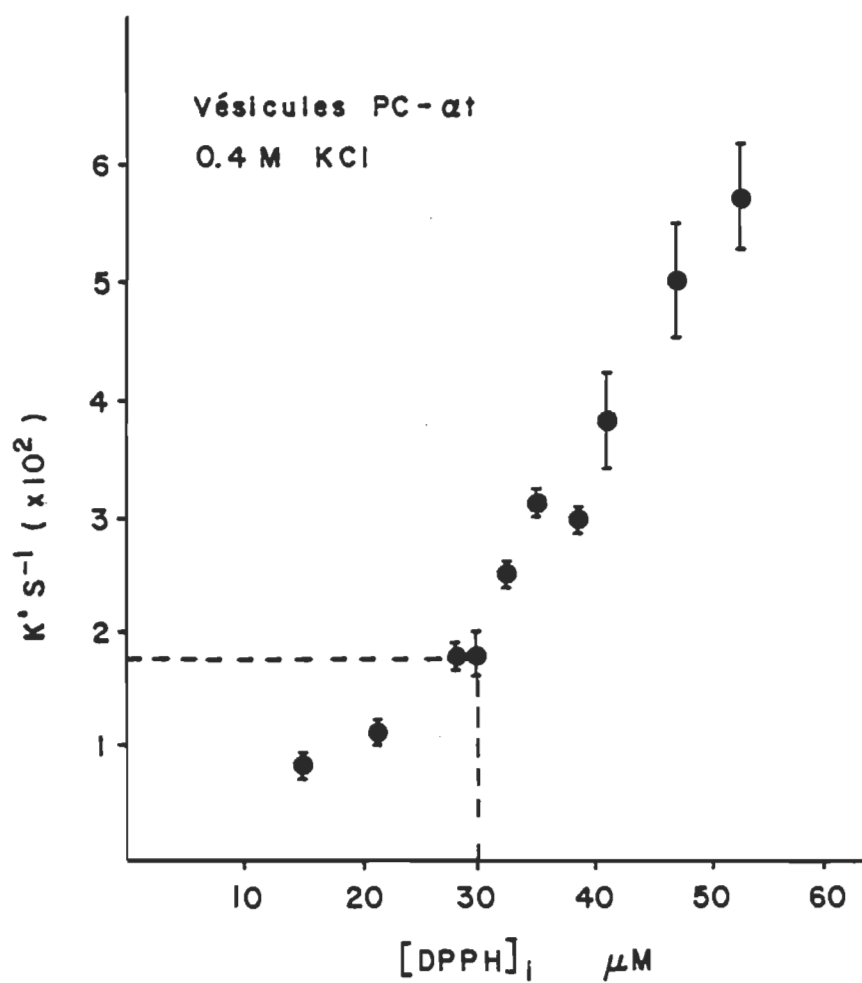


Figure 10. Variation de  $K'$  avec  $[\text{DPPH}]_i$  dans les vésicules de PC- $\alpha$ t 0.4M KCl.

dix secondes.

La figure 10 montre la variation de  $K'$  avec la concentration initiale de DPPH pour la réaction dans les vésicules de PC (0,4M KCl). Cette figure ne présente pas la même linéarité que les courbes obtenues dans les solutions alcooliques (voir fig. 7). Il est toutefois difficile d'obtenir des résultats à fortes concentrations de DPPH car celui-ci a tendance à se déposer au fond de la solution. Nous sommes donc limités dans la gamme de concentrations disponibles (15 à 55  $\mu\text{M}$ ), contrairement aux cas des solutions éthanol/eau (15 à 80  $\mu\text{M}$ ).

Il nous est difficile de préciser pourquoi les résultats obtenus dans les vésicules ne présentent pas la linéarité de ceux obtenus dans les mélanges éthanol/eau. Il est possible que le système aie besoin d'une certaine concentration de DPPH avant que la réaction n'aie lieu. Ceci expliquerait pourquoi les points ne s'alignent pas avec l'origine. Cependant étant donné les limites mentionnées plus haut, nous ne pouvons donner de plus amples informations concernant ce phénomène. Nous utiliserons donc en première approximation l'équation 3.2 afin de déterminer  $K$ , la constante de deuxième ordre de la réaction. Pour ce faire nous diviserons les valeurs de  $K'$  obtenues à 30  $\mu\text{M}$  de DPPH par cette concentration. Nous verrons toutefois ultérieurement que cette approximation n'altère pas outre mesure les déterminations de constantes diélectriques dans les vésicules (voir section IV.2., tableau 5).

### III.3. Effet de polarité sur la réaction DPPH- $\alpha$ t.

La réaction entre le DPPH et l' $\alpha$ -tocophérol va dépendre de façon importante de la polarité du solvant utilisé (Bellemare et Fragata 1980, Boguth 1969). Nous avons vu lors de l'analyse de l'effet de concentration initiale de DPPH sur la réaction dans les mélanges éthanol/eau (section III.2.1.) que la constante de deuxième ordre de la réaction augmentait avec la quantité d'eau attribuable à une hausse de la constante diélectrique de la solution.

Afin de quantifier cet effet de polarité, nous avons tracé le graphique de  $\ln K$  en fonction du paramètre de Onsager  $[(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)]$ . Ce paramètre servira d'indice de polarité pour le solvant. Les valeurs de constante diélectrique pour chaque mélange ont été obtenues à partir des données compilées par Timmermans (1960), en se basant sur le fait que l'éthanol forme un azéotrope avec l'eau (96% éthanol/eau). Donc lorsque nous parlons d'éthanol 100% nous référons à cet azéotrope. La figure 11 nous montre la dépendance de  $\ln K$  sur le paramètre de Onsager. On constate que la relation entre les deux obéit à une droite. Cette droite est représentée par l'équation:

$$\ln K = -85.19 + 192.72 [(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)] \quad (3.3)$$

où le coefficient de corrélation est de 0,997.

Ce résultat diffère quelque peu de celui obtenu précédemment par

d'autres chercheurs (Bellemare et Fragata 1980). Ceci pourrait être attribué à des impuretés présentes dans le DPPH. La purification d'un radical libre est rendu difficile par le fait que ces molécules s'adsorbent fortement sur la silice et ne peuvent donc pas être facilement désorbées par les solvants organiques. De plus, le rendement de recristallisation du DPPH dans un mélange benzène/ligroïne (2:1) est très faible (Poirier et al. 1952) ce qui fait de cette technique une méthode peu efficace de purification. Ceci explique pourquoi nous avons utilisé le DPPH sans purification préalable.

Cependant, les résultats obtenus par Bellemare et Fragata (1980) peuvent être comparés aux nôtres si on utilise  $\ln K$  au lieu de  $\ln K'$  comme l'on fait ces derniers (voir figure V de Bellemare et Fragata 1980). Par exemple, ceux-ci obtiennent une valeur de  $K'$  dans les vésicules de PC (0.1 M NaCl) de  $0.016 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  comparativement à  $0.029 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  dans ce travail (voir section III.5.). Toutefois si on divise ces deux valeurs par la concentration initiale de DPPH utilisée pour chaque cas, nous obtenons  $788 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et  $982 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  respectivement pour les valeurs de  $K$ . Ainsi, en corrigeant les résultats de Bellemare et Fragata (1980) en tenant compte de la concentration de DPPH et en extrapolant leur valeur de  $K$  obtenue dans les vésicules ( $788 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) sur la courbe corrigée, nous obtenons une valeur de constante diélectrique identique à la notre (voir figure 11).

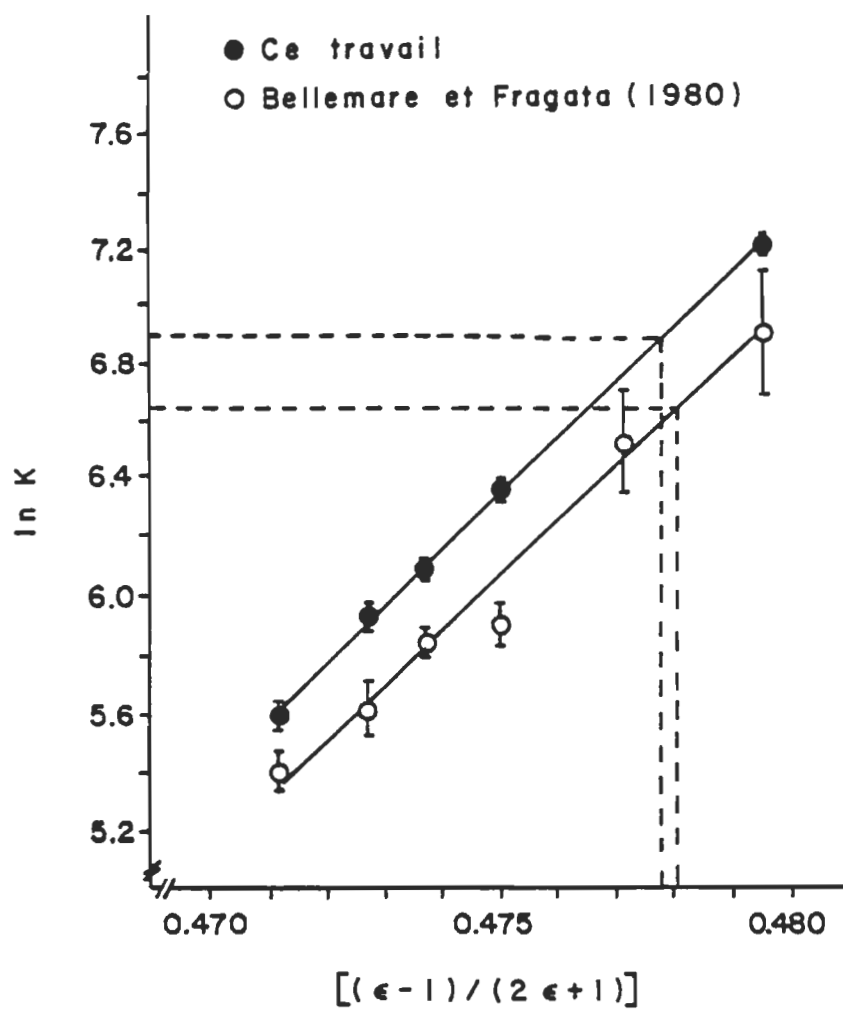


Figure 11. Graphique de  $\ln K$  en fonction de  $[(\epsilon-1)/(2\epsilon+1)]$ .

Un point important se dégage de ceci, il est important de refaire la courbe de  $\ln K$  en fonction du paramètre de Onsager à chaque fois que l'on change le lot de DPPH dans le but de s'assurer que les résultats obtenus avec les vésicules sont significatifs. Au cours de cette étude deux lots de DPPH ont été utilisés (BDH # 58625300 et # 60035100). Nous avons vérifié que ces deux lots donnent lieu à des valeurs de  $K$  identiques dans des expériences faites avec des mélanges éthanol/eau.



### III.4. Discussion.

Nous avons vu au cours des pages précédentes qu'il existe quelques différences au niveau de la réaction DPPH -  $\alpha$ t entre les résultats obtenus en solution (section III.2.1) et à l'interface eau/lipide (section III.2.2.). Par exemple, dans des vésicules on observe une première réaction très rapide (moins de 10 secondes) que l'on ne retrouve pas dans les mélanges éthanol/eau. Nous avons suggéré quelques hypothèses afin d'expliquer ce phénomène. Cependant, des études faites éventuellement avec un système à injection rapide pourraient amener de nouveaux éléments qui permettraient de confirmer ou infirmer ces hypothèses. Il serait intéressant par exemple de vérifier si cette première réaction est sensible à la polarité ou à la force ionique.

Un deuxième point qui diffère entre les résultats obtenus en solution et dans les vésicules se situe au niveau de la dépendance de  $K'$  sur la concentration initiale de DPPH ( $[DPPH]_i$ ). Ainsi, en solution, on observe une dépendance linéaire qui est conforme à la théorie (équation 3.2), tandis que dans les vésicules (figure 10) le phénomène ne montre pas la même linéarité. Ceci nous a contraint à utiliser une approximation afin d'évaluer  $K$ . Cependant, les valeurs de constante diélectrique déterminées à partir de  $K$  s'accordent très bien avec celles obtenues par d'autres chercheurs (voir tableau 5), donnant ainsi à notre approximation une certaine validité. Toutefois, nous sommes conscients de l'importance de préciser éventuellement cette différence de comportement.

## CHAPITRE IV: EFFETS DES IONS MONOVALENTS SUR LA CONSTANTE DIELECTRIQUE DE L'INTERFACE EAU-LIPIDE

### IV.1. Effet de la force ionique sur la réaction DPPH- $\alpha$ t

Avant de passer à la détermination de la constante diélectrique dans les vésicules de PC., il est essentiel de s'assurer que la réaction entre le DPPH et la sonde moléculaire ( $\alpha$ t) n'est pas dépendante de la force ionique du milieu. Nous avons vu dans la section I.3. que les ions peuvent interagir avec une surface lipidique. Etant donné que notre intérêt est d'élucider l'effet de cette interaction sur la polarité de l'interface eau-lipide, nous devons nous assurer que la force ionique ne modifie pas la vitesse de la réaction qui nous sert d'indice de polarité. Si aucune modification de la vitesse ne survient lorsqu'on augmente la concentration en espèce ionique dans le milieu réactionnel alors la réaction peut servir à des déterminations de polarité dans les vésicules.

Pour ce faire, nous avons étudié la réaction entre les deux espèces dans des mélanges dioxanne/tampon tris-HCl 61% V/V contenant différentes proportions de NaCl. Le mélange de ces deux solvants présente l'avantage de pouvoir facilement dissoudre un électrolyte comme le NaCl et possède une constante diélectrique d'un ordre de grandeur adéquat pour faire des mesures de cinétiques. De plus, le DPPH se dissout aisément dans le dioxanne et ne semble pas affecté par la présence du tampon dans le mélange.

Nous avons donc mesuré la vitesse de réaction en fonction de la concentration de NaCl contenu dans le mélange dioxanne/tampon tris-HCl. Le tableau 3 nous donne les résultats compilés pour les valeurs de la pseudo-constante de premier ordre de la réaction,  $K'$ , en fonction de la force ionique de la solution. Ces données sont fournies également sur la figure 12 afin d'être comparées avec les valeurs obtenues dans les vésicules de PC. On constate qu'il n'y a pas ou très peu de variations dans la vitesse de la réaction lorsqu'on augmente la force ionique de la solution. La réaction n'est donc pas sensible à la force ionique et s'avère ainsi une méthode pour mesurer les variations de constantes diélectriques de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées des vésicules de PC en fonction de la concentration d'ions monovalents. En effet, comme nous l'avons spécifié précédemment cette non-dépendance sur la force ionique est une condition essentielle pour les mesures dans les vésicules.

#### IV.2. Effet de la force ionique sur la constante diélectrique des vésicules de PC.

Nous avons donc étudié la réaction entre le DPPH et l'alpha-tocophérol dans les vésicules en fonction de la concentration et de la taille des ions monovalents. Les études ont porté principalement sur l'effet du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$  étant donné l'importance de ces ions au niveau biologique. Nous avons toutefois ajouté à ces derniers le  $\text{Li}^+$  afin d'avoir un autre élément de comparaison pour l'effet de la taille de l'ion hydraté. La figure 12

Tableau 3  
 Valeur de  $K'$  en fonction de  $[NaCl]$  dans les mélanges  
 dioxanne/tampon tris-HCl 61% V/V.

$[NaCl]$	1er essai	2e essai	3e essai
M	$K' \text{ s}^{-1}$	$K' \text{ s}^{-1}$	$K' \text{ s}^{-1}$
0.0	0.0157	0.0167	0.0162
0.1	0.0157	0.0159	0.0162
0.2	0.0165	0.0172	0.0168
0.25	0.0166	0.0175	0.0180
0.3	0.0183	0.0175	0.0173
0.4	0.0162	0.0167	0.0172
0.5	0.0146	0.0176	0.0165

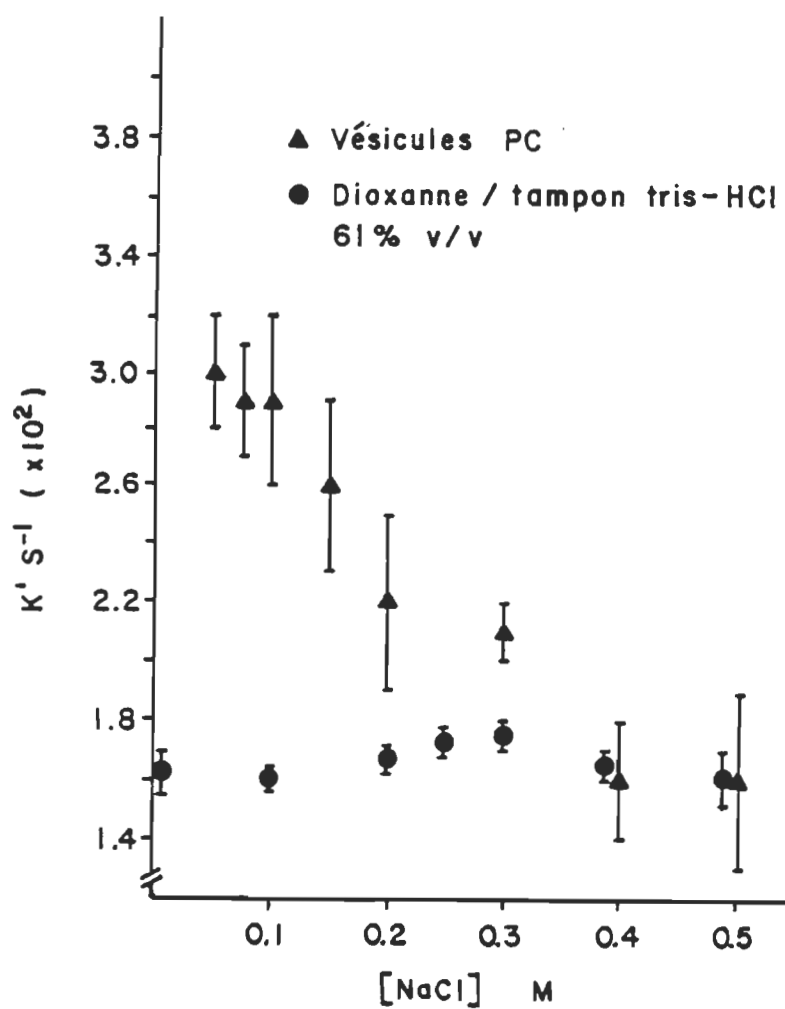


Figure 12. Variations de  $K'$  en fonction de  $[\text{NaCl}]$  dans les vésicules de PC- $\alpha$ t et dans les mélanges dioxanne/tampon tris-HCl 61% V/V.

nous donne les résultats obtenus pour  $K^+$  avec le NaCl dans la phase aqueuse. Chaque point a été déterminé à la même concentration de DPPH (voir section II.3.3.), soit 30  $\mu$ M, ce qui rend impossible l'usage de  $K'$ . Nous avons ajouté à ces mesures celles effectuées dans les mélanges dioxanne/tampon afin de bien montrer que l'effet observé dans les vésicules ne provient pas de la variation de force ionique mais bien du changement de la constante diélectrique. On constate que  $K'$  diminue lorsque la concentration de NaCl de la phase aqueuse augmente, passant de  $0.030 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$  (0.05M) à  $0.016 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  (0.5 M).

Le même type de variation est obtenu lorsque le KCl est présent dans la phase aqueuse (voir figure 13). Cependant, la diminution de la pseudo-constante de premier ordre est plus rapide, i.e., elle survient à des concentrations légèrement inférieures à celles du NaCl. Par exemple, à 0.2 M on obtient un  $K'$  de  $0.018 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$  pour le KCl et de  $0.022 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  pour le NaCl. Afin de confirmer cet effet de taille de l'ion hydraté, nous avons étudié la cinétique de la concentration de LiCl. Le  $\text{Li}^+$  possède un rayon supérieur à celui du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$  (Cotton et Wilkinson 1980). Les résultats obtenus avec cet ion sont donnés sur la figure 14. Celle-ci nous permet de constater à nouveau la diminution de  $K'$  en fonction de l'augmentation de la force ionique. Ceci confirme également l'effet de taille de l'ion hydraté car les valeurs de  $K'$  obtenues avec le LiCl en phase aqueuse sont respectivement plus élevées que le NaCl et le KCl pour une même concentration. Par exemple, à 0.2 M,  $K'$  est de  $0.025 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  pour le LiCl, ce qui est plus élevé que les valeurs citées précédemment. Nous avons résumé dans le tableau 4 les valeurs de  $K'$  pour les différentes

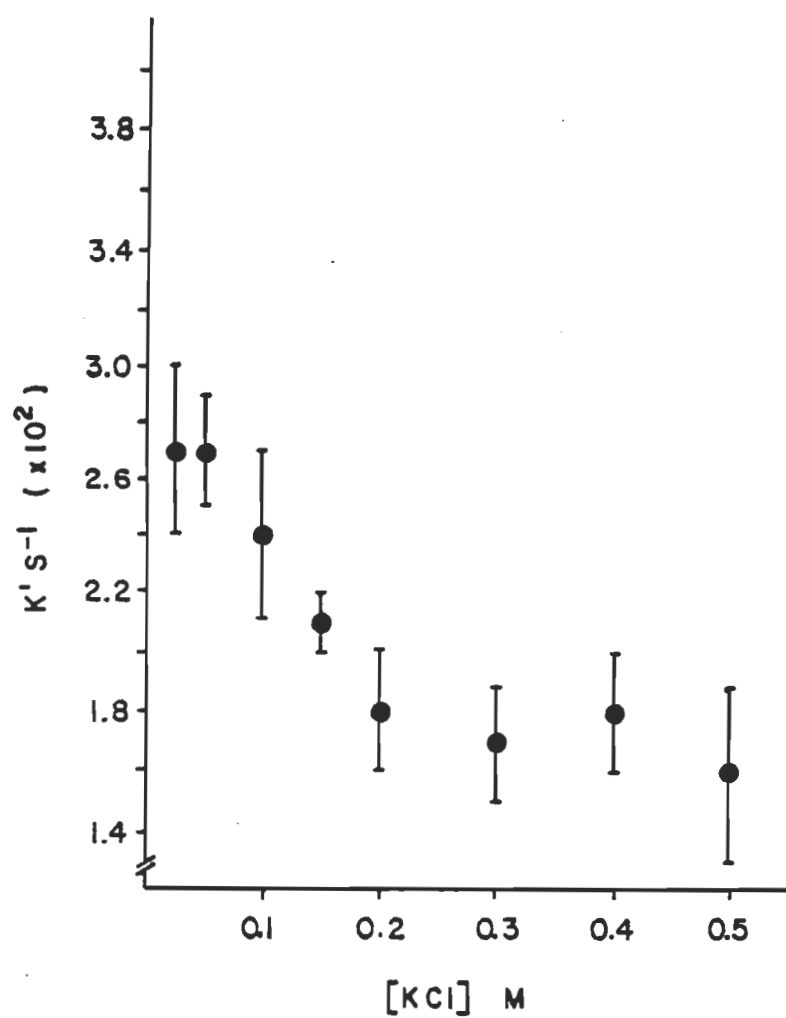


Figure 13. Variation de  $K'$  en fonction de  $[\text{KCl}]$  dans les vésicules de PC- $\alpha$ t.

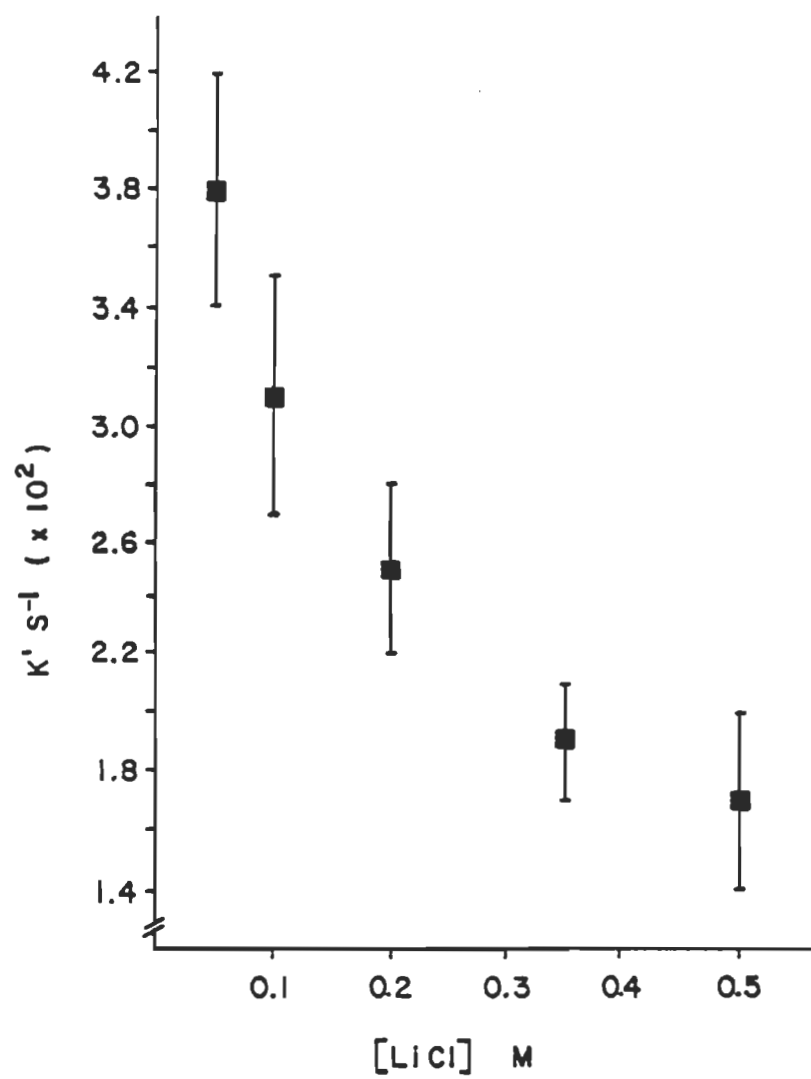


Figure 14. Variation de  $K'$  en fonction de  $[\text{LiCl}]$  dans les vésicules de PC- $\alpha$ t.



Tableau 4  
Valeur de  $K'$  en fonction de la concentration et de  
la taille des ions monovalents.

[Sel]	$K' (LiCl(1))$	$K' (NaCl)$	$K' (KCl)$
M	$s^{-1}$	$s^{-1}$	$s^{-1}$
0,05	$0.038 \pm 0.004$	$0.030 \pm 0.003$	$0.027 \pm 0.002$
0.1	$0.031 \pm 0.004$	$0.029 \pm 0.003$	$0.024 \pm 0.003$
0.2.	$0.025 \pm 0.003$	$0.022 \pm 0.003$	$0.018 \pm 0.002$
0.5	$0.017 \pm 0.003$	$0.016 \pm 0.003$	$0.016 \pm 0.003$

(1) Rayon hydraté:  $Li^+$  (3.40 Å),  $Na^+$  (2.76 Å),  $K^+$  (2.32 Å)

Réf.: Cotton et Wilkinson (1980)

concentrations et les différents ions monovalents présents dans la phase aqueuse entourant les vésicules de PC. Il est aisé de constater que  $K'$  diminue lorsque la concentration augmente et lorsque la taille de l'ion hydraté diminue.

A l'aide de l'équation 3.2, nous avons calculé pour chaque  $K'$  la valeur de  $K$  correspondante. Ceci n'est qu'une approximation mais ce traitement n'affecte que très peu les déterminations de constantes diélectriques dans les vésicules. Par la suite, connaissant  $K$ , il est possible à partir de l'équation 3.3 de calculer la constante diélectrique correspondant à chaque concentration d'ions monovalents. Le résultat d'une telle opération est donné sur la figure 15. On voit que la constante diélectrique de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées des vésicules de PC passe de 35.7 à 29.5 lorsque la concentration de LiCl passe de 0.05 M à 0.5 M. Des variations sensiblement du même ordre de grandeur sont observées pour le NaCl (33.6 à 29.1) et le KCl (32.8 à 29.1). Remarquons qu'il nous a été impossible de déterminer la constante diélectrique de l'interface en absence de sel car la réaction est trop rapide pour être suivie avec le spectrophotomètre utilisé lors de cette étude. Cette mesure nécessiterait l'emploi d'un système à injection rapide capable de mesurer les premières 10 secondes de la réaction.

Aussi, nous n'avons pas effectué de mesures à des concentrations de sel au-delà de 0.5 M, car à de telles concentrations des phénomènes d'aggrégation des vésicules se produisent. Nous avons en effet observé la formation d'une couche opaque de vésicules flottant à la surface du tube

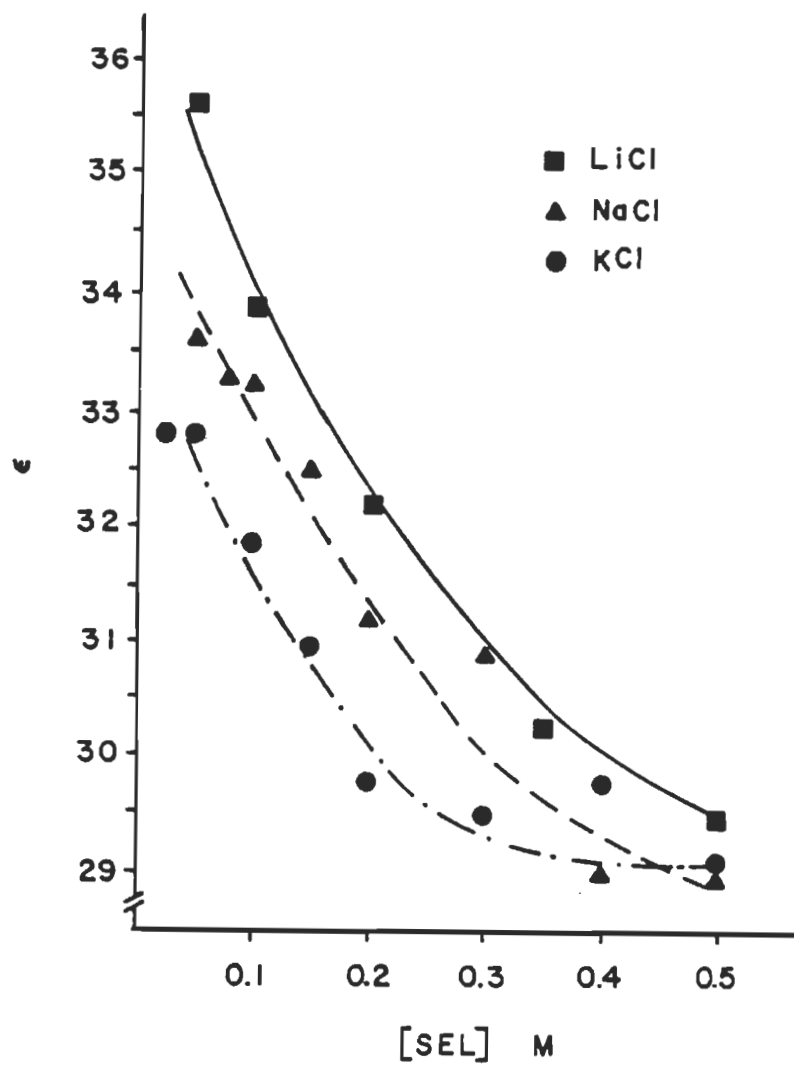


Figure 15. Variation de  $\epsilon$  en fonction de la concentration de KCl, NaCl et LiCl dans les vésicules de PC- $\alpha$ t.

après centrifugation à des forces ioniques supérieures à 0.5 M. Par ailleurs, il a été observé que de fortes concentrations de sel causent aussi l'aggrégation de micelles (Mazer et al. 1976).

Nos résultats indiquent en outre de façon très nette que la polarité de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées diminue lorsque la concentration en ions monovalents de la phase aqueuse augmente. On constate aussi que l'ordre de grandeur de la constante diélectrique de cette interface est plus faible que celle d'une solution aqueuse. Nous obtenons une valeur de  $\epsilon$  de 29 pour l'interface à 0.5 M NaCl comparativement à 73 pour une solution aqueuse de même concentration (Hasted et al. 1948).

Nous avons compilé dans le tableau 5 les données disponibles de la littérature concernant les valeurs de constante diélectrique de l'interface eau/lipides pour différents systèmes membranaires artificiels (vésicules, micelles, etc.). La comparaison entre nos résultats et ceux d'autres chercheurs (Gillepsie 1970, Colbow et Chong 1975, Fernandez et Fromherz 1977, Thomas 1980, Iwamoto et Sunamoto 1981, Laver et al. 1983, Kanashina et al. 1984) montre que notre méthode d'évaluation de la polarité est raisonnable malgré les quelques approximations utilisées pour parvenir à ces valeurs. Il est intéressant de constater que les valeurs de citées dans le tableau 5 diffèrent très peu non seulement d'un auteur à l'autre mais aussi en fonction du système lipidique utilisé. Par exemple, Fernandez et Fromherz (1977) trouvent que la constante diélectrique est de l'ordre de 32 à la surface de micelles de bromure de cétyltriméthylam-

Tableau 5  
Valeur de  $\epsilon$  à l'interface eau/lipide

Modèle membranaire	Site de détermination	Méthode utilisée	Références	
Multicouches de PC	Tête polaire/eau	Fluorescence	32	Celbow et Chong (1975)
Micelles	Surface	Fluorescence	32	Fernandez et Fromherz (1977)
Micelles	Surface	Fluorescence	35-45	Thomas (1980)
Vésicules	Tête polaire/ chaînes hydrocarbonées	Fluorescence	32	Iwamoto et Sunamoto (1981)
Bicouches lipidiques	Tête polaire/ chaînes hydrocarbonées	Constante de temps élec.	30-37	Laver <u>et al.</u> (1983)
Micelles	Surfaces	Adsorption	29-33	Kaneshina <u>et al.</u> (1984)
Vésicules	Tête polaire/ chaînes hydrocarbonées	Réaction DPPH- $\alpha$ t	29-36	Ce travail
Vésicules	Tête polaire/ chaînes hydrocarbonées	Réaction DPPH- $\alpha$ t	26	Bellemare et Fragata (1980)

monium. Ceci est comparable aux valeurs observées dans les vésicules de phosphatidylcholine (Iwamoto et Sunamoto 1981) et dans les bicouches lipidiques planaires de glycérolmonooléate (Laver et al. 1984).

Certains travaux (Thomas 1980, Hashimoto et Thomas 1984, Lianos et Zana 1980) montrent qu'il y a un effet de la force ionique sur la polarité de l'interface eau/lipides. Par exemple, la valeur de  $\epsilon$  à la surface de micelles formées de laurylsulfate de sodium est de 45 en absence de sel puis chute à 35 lorsque la concentration de NaCl est de 0.2 M (Thomas 1980). Des études récentes (Hashimoto et Thomas 1984) démontrent clairement que la présence de NaCl diminue le rapport de pics I/III de l'intensité de fluorescence du pyrène incorporé dans des micelles de taurocholate de sodium. On sait que ce rapport de pics est sensible à la polarité du milieu (Dong et Winnick 1982); une diminution de ce rapport correspondant à une constante diélectrique plus faible. Le même résultat est obtenue avec les micelles de dodécylsulfate de sodium (Lianos et Zana 1980). Ces chercheurs diffèrent toutefois d'opinion au niveau de l'explication de ce phénomène. Pour Hashimoto et Thomas (1984), cette diminution de polarité peut être attribuée aux forces intensives de champ électrique au voisinage de la surface micellaire tandis que Lianos et Zana (1980) optent plutôt pour une déshydratation de l'interface due à l'attraction de type électrostatique existant entre les ions et les molécules d'eau. Il est à noter que ce phénomène de déshydratation de l'interface peut s'apparenter au "Salting Out" provoqué par la présence d'électrolytes dans les mélanges eau/solvants organiques (Edsall et Wyman 1958).

Nous allons analyser dans les sections suivantes ces deux hypothèses afin de vérifier dans quelles mesures elles sont applicables à nos résultats. Nous étudierons d'abord l'effet "Salting Out", ou de déshydratation de l'interface en analysant les données pertinentes de la littérature sur le sujet. Puis, nous calculerons l'intensité du champs électrique au voisinage des vésicules en nous basant sur deux méthodes différentes de calcul. Nous verrons au cours de cette deuxième analyse qu'il est important de prendre en considération la formation de paires d'ions dans les milieux de polarité inférieurs à celle de l'eau (Bockris 1972, Fuoss 1959).

#### IV.3. Effet de "Salting Out".

L'effet de "Salting Out" a bien été décrit dans la littérature (Desnoyers et Jolicoeur 1969, Beunen et Ruckenstein 1982). On peut décrire le phénomène comme étant essentiellement une redistribution des molécules d'eau entre une phase organique (ou lipidique) et un environnement aqueux due à la présence d'espèces ioniques attractives. Une conséquence de ceci au niveau de l'interface serait une déshydratation progressive de cette région avec l'augmentation de la concentration en ions monovalents. La perte de molécules d'eau entraînerait une baisse de constante diélectrique telle qu'observée dans les vésicules de PC.

Certains arguments viennent appuyer l'hypothèse de "Salting Out" de

l'interface. Par exemple, des travaux de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) de dispersion aqueuse de phosphatidylcholine (Sederman et al. 1983) ont montré que l'eau contenue dans la phase liquide cristalline est expulsée lorsque l'on ajoute du LiCl dans le milieu aqueux. L'addition d'ions monovalents pourrait induire un changement conformationnel au niveau de la tête polaire résultant en un groupement phosphocholine orienté plus perpendiculairement au plan de la membrane (Sederman et al. 1983). En absence de sel, les têtes polaires zwitterioniques, comme celle de la phosphatidylcholine, sont vues comme étant étendues parallèlement à la surface membranaires (Sundler 1984, Griffin et al. 1978). Les ions monovalents pourraient diminuer les interactions électrostatiques existant entre les groupes polaires et ainsi les réorienter.

Nous avons illustré sur la figure 16 un mécanisme possible pour cet effet de "Salting Out". En absence de sel, les têtes polaires sont parallèles à la surface et on retrouve une certaine quantité d'eau entre les lipides. En augmentant la concentration en ions monovalents, on modifie les interactions électrostatiques et on force une partie de l'eau à quitter la phase lipidique. On en arrive finalement à un stade où toute l'eau susceptible d'être expulsée de l'interface est sortie et il ne reste que les molécules d'eau participant à la couche d'hydratation des phospholipides.

Ce mécanisme ne nécessite donc pas la présence des ions monovalents à l'intérieur de l'interface, mais simplement une modification des forces



électrostatiques entre les groupements polaires. D'ailleurs, certains travaux (Ashcroft et al. 1981) ont montré qu'il n'y avait pas d'évidence de pénétration des ions dans l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées. Les données disponibles à partir de la spectroscopie Raman (Lis et al. 1975) et par calorimétrie différentielle à balayage (Simon et al. 1975) indiquent que les ions monovalents auraient peu d'effet au niveau des chaînes de carbones de la PC. Cependant, il demeure possible que les ions puissent attirer les molécules d'eau présentes entre les groupes polaires.

Afin de quantifier cet effet de "Salting Out" de l'interface, nous avons utilisé une équation reliant une constante de vitesse réactionnelle et la force ionique (Laidler 1965).

$$\ln K = \ln K_0 + bc_i^{1/2} \quad (4.1)$$

où K est la constante de vitesse à la concentration ionique  $c_i$ ,  $K_0$ , la constante de vitesse en absence de sel et b est une constante qui dépend de la charge ionique.

Nous avons montré dans la section IV.1. qu'il n'y avait pas d'effet direct de la force ionique sur la réaction DPPH- $\alpha$ t. Toutefois il serait possible d'expliquer l'effet observé dans les vésicules par un mécanisme indirect où la force ionique influencerait la polarité (constante diélectrique) qui elle modifierait la constante de vitesse réactionnelle. Nous avons donc appliqué l'équation 4.1 à nos résultats, nous obtenons

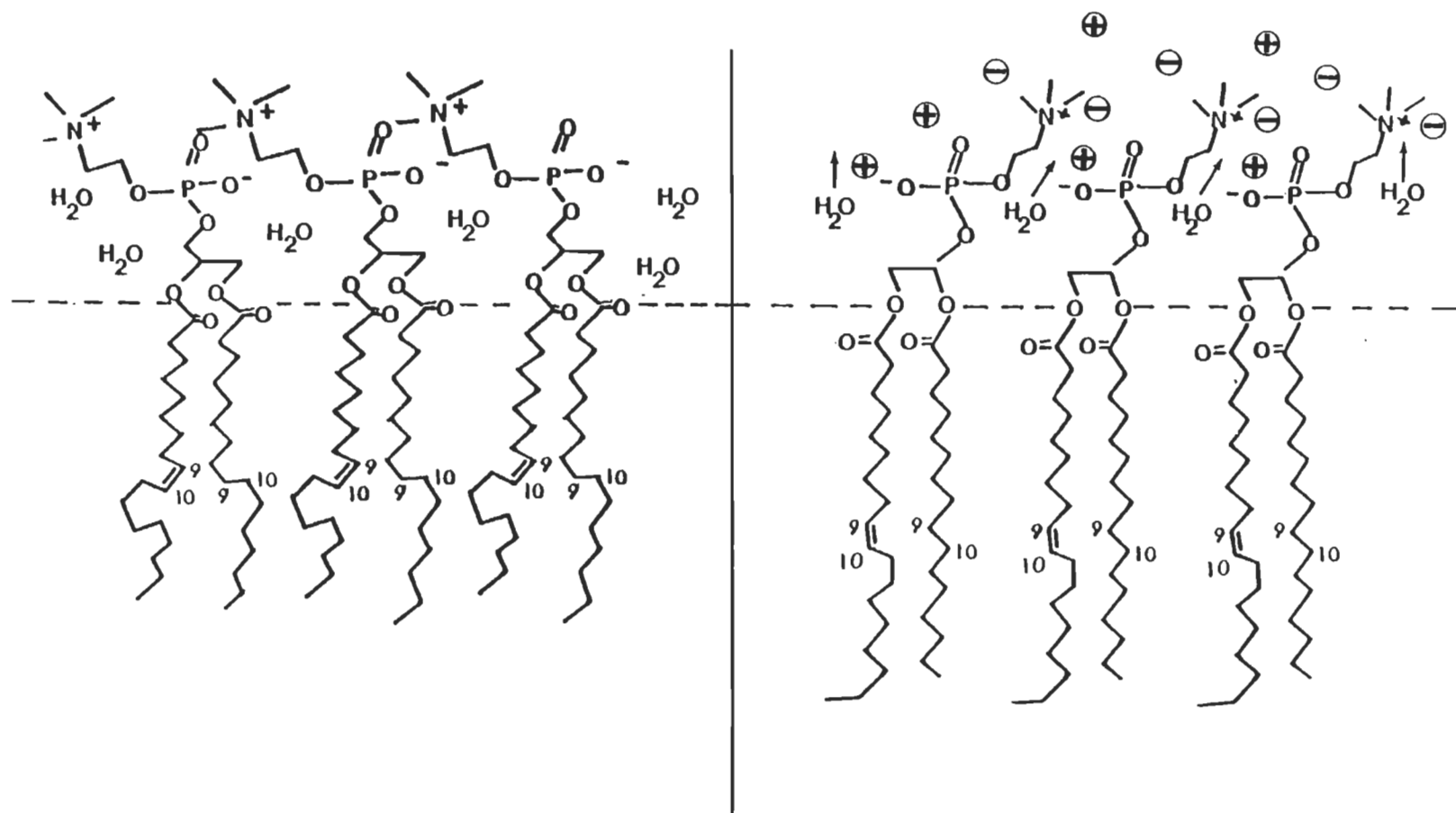


Figure 16. Hypothèse du "Salting Out": a. sans sel, b. avec sel.

pour chaque sel les équations suivantes:

$$\ln K' = -2.91 - 1.73 c_i^{1/2} \quad (\text{Li}^+) \quad (4.2)$$

$$\ln K' = -3.11 - 1.51 c_i^{1/2} \quad (\text{Na}^+) \quad (4.3)$$

$$\ln K' = -3.33 - 1.43 c_i^{1/2} \quad (\text{K}^+) \quad (4.4)$$

On obtient effectivement des relations linéaires entre la force ionique et la constante de vitesse pour chaque sel (voir figure 17). Cependant les valeurs calculées pour  $K_0$  diffèrent pour chaque ion, ce qui est contraire à la théorie. En effet, on devrait obtenir la même valeur pour chaque ion, puisqu'en absence de sel le système est le même. Il semble donc peu vraisemblable que l'effet "Salting Out" puisse expliquer nos résultats en dépit de certaines observations expérimentales qui font appel à un tel effet. En fait, le cadre théorique qui supporte cet effet ne permet pas encore de tirer des conclusions valables en ce qui concerne nos données expérimentales. De plus, cet effet ne permet pas de rendre compte de l'effet de la taille de l'ion hydraté. Des travaux (Desnoyers et Jolicoeur 1969) ont effectivement montré que les équations théoriques de "Salting Out" peuvent expliquer les variations dues au dimension du composé non électrolyte, mais elles sont généralement peu sensibles aux variations dans la taille des ions. Ceci apparaît nettement lorsque l'on compare les équations théoriques avec les données expérimentales (Desnoyers et Jolicoeur 1969). Nous reviendrons ultérieurement sur cette question de l'effet de l'ion hydraté.

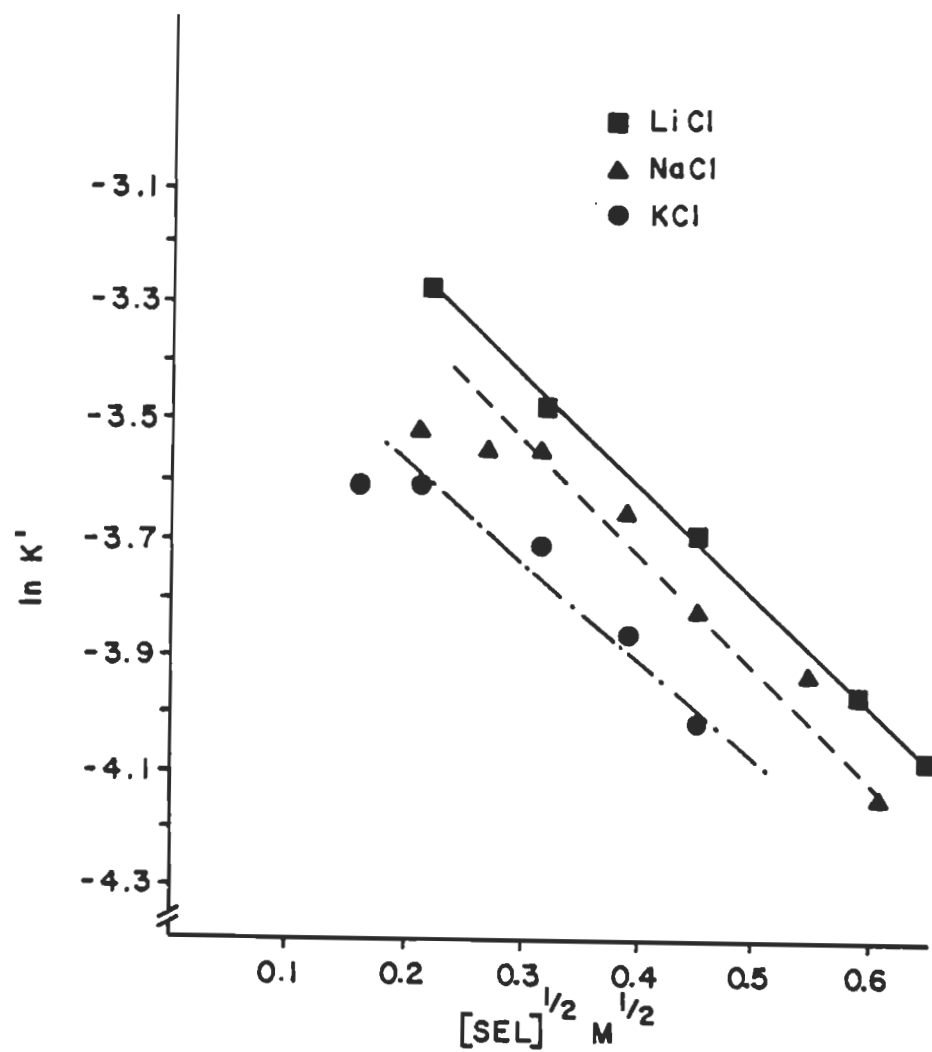


Figure 17. Variation de  $K'$  en fonction  $[sel]^{\frac{1}{2}}$  dans les vésicules de PC- $\alpha$ t.

#### IV.4. Champ électrique au voisinage des surfaces membranaires.

Nous examinerons dans cette section une autre explication possible de la dépendance de la polarité de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées avec la concentration des ions monovalents. Il s'agit du champ électrique qui existe au voisinage d'une surface lipidique. Un champ électrique intense pourrait causer une saturation diélectrique des couches aqueuses entourant une vésicule (Wang et Bruner 1977, Onsager 1936). Des études effectuées sur des membranes planaires de PC et de dipicrylamine (dpa) (Wang et Bruner 1977, Bruner 1978, Carius 1979) ont montré que le champ créé par de fortes concentrations de sel cause une diminution de la constante diélectrique des molécules d'eau situées près de la surface membranaire.

Il est possible d'évaluer le champ électrique ( $E$ ) de la surface lipidique en connaissant la densité de charges de surface ( $\sigma$ ) et la constante diélectrique associée à cette région. Ces quantités sont reliées entre elles par la loi de Gauss.

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon_0 \epsilon} \quad (4.5)$$

ou par la simplification (voir Wang et Bruner 1977):

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon_0} \quad (4.6)$$

où  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide ( $8.854 \times 10^{-12}$  coul<sup>2</sup> newton<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>). Pour  $\epsilon$ , nous avons utilisé les valeurs calculées dans les vésicules à l'aide de l'équation 3.3. Ces valeurs sont données sur la figure 15. La densité de charges de surface ( $\sigma$ ) peut être obtenue par deux méthodes de calcul.

La première a été développée par Altenbach et Seelig (1984) et est basée sur le nombre d'ions présents à l'intérieur de l'interface. L'autre méthode consiste à appliquer la théorie de Gouy-Chapman et de calculer directement la densité de charges de surface. Dans les sections suivantes nous allons calculer  $\sigma$  avec chacune de ces méthodes puis nous comparerons les résultats ainsi obtenus.

#### IV.4.1. Calcul de $\sigma$ avec l'équation de Altenbach et Seelig.

Cette première méthode de calcul fut à l'origine appliquée à l'absorption des ions  $\text{Ca}^{+2}$  sur des bicouches de phosphatidylcholine (Altenbach et Seelig 1984). Nous avons modifié leur équation pour le cas des ions monovalents.

$$\sigma = \frac{e_0 C_{int}}{S} \quad (4.7)$$

$$C_{int} = N_i / N_{PC} \quad (4.8)$$

où  $e_0$  est la charge élémentaire ( $1.602 \times 10^{-19}$  coul),  $C_{int}$ , le nombre d'ions interfaciales par molécule de PC,  $S$ , l'aire moléculaire de la phosphatidylcholine ( $73 \text{ \AA}^2$ ) et  $N_i$  et  $N_{PC}$  sont respectivement le nombre d'ions monovalents dissociés et le nombre de molécules de PC présentes à l'interface. Les valeurs de  $e_0$  et de  $S$  étant connues, il nous reste à déterminer  $C_{int}$ . Pour ce faire on doit tenir compte de la formation de paires d'ions due à la polarité plus faible près de la surface de la bicouche. En effet, on ne peut considérer dans de telles conditions que le LiCl, le NaCl et le KCl se comportent comme des électrolytes forts (Tremillon 1971), leurs comportements va plutôt se rapprocher des électrolytes faibles, i.e., non complètement dissociés. Il a d'ailleurs été montré par calcul électrostatique que ces paires d'ions peuvent se former à l'entrée des canaux à ions qui traversent les membranes (Monoi 1982). Nous devons donc corriger la concentration des ions pour tenir compte de ce phénomène.

La formation de paires d'ions ou d'associations ioniques a été décrite dans la littérature (Fuoss 1959). On considère dans cette théorie que seulement les ions en contact physique constituent une paire d'ions sans regard du mécanisme qui stabilise ce contact. Une paire d'ions n'a donc pas de charge nette puisqu'elle est formée d'ions de charges opposées. Elle ne participe donc pas à la densité de charges de surface. Il est possible à partir d'équations théoriques d'évaluer la proportion de paires d'ions dans un milieu de constante diélectrique  $\epsilon$ . Dans une solution électrolytique on retrouve l'équilibre:



On peut alors définir une constante d'association,  $K_{\text{ion}}$ , des ions comme étant:

$$K_{\text{ion}} = \frac{[A^+, B^-]}{[A^+] [B^-]} \quad (4.10)$$

où  $[A^+, B^-]$  est la concentration de paires d'ions et  $[A^+]$  et  $[B^-]$  la concentrations respectives d'ions positifs et négatifs de la solution. En se basant sur la théorie de Fuoss (1959), Trémillon (1971) a trouvé une relation entre la constante d'association et la constante diélectrique soit:

$$\log K_{\text{ion}} = \text{cte} + \frac{0,43 z_1 z_2 N e a^2}{a R T} \frac{1}{\epsilon} \quad (4.11)$$

où  $z_1$  et  $z_2$  sont les charges des ions positifs et négatifs,  $N$ , le nombre d'Avogadro,  $R$ , la constante des gaz parfaits,  $T$ , la température en degrés Kelvin et  $a$ , le rayon de la paire d'ions. Les autres termes ont été définies précédemment.

Cette équation pose toutefois le problème d'évaluer  $a$ , le rayon de la paire d'ions, car le type de contact existant entre les ions constituant une paire n'est pas bien connu (Trémillon 1971; Bockris 1972). Pour palier à cette difficulté nous avons déterminé une relation empirique entre  $K_{\text{ion}}$



et  $\epsilon$  en utilisant les données disponibles de la littérature (figure 18) (Trémillon 1971, Hawes et Kay 1965, Davies 1962). Nous obtenons ainsi la relation:

$$\log K_{\pm\pm} = -0.02 + 44.48 \frac{1}{\epsilon} \quad (4.12)$$

Cette équation est du même type que celle définie précédemment (eq. 4.11), cependant la relation entre le coefficient angulaire 44.48 et celui de l'équation 4.11,  $0.43 \frac{z_1 z_2 N e^2}{a R T}$ , n'est pas très claire (Trémillon 1971) ce qui confère à l'équation 4.11 un caractère approximatif. Nous utiliserons donc préférentiellement la relation empirique (4.12) afin d'évaluer la constante d'association des ions.

En solution, les paires d'ions et les ions libres sont en équilibre. en admettant que les concentrations d'ions positifs et négatifs sont égales, on peut écrire:

$$[A^+]=[B^-] = C_{\pm\pm} \quad (4.13)$$

$$[A^+, B^-] = C_0 - C_{\pm\pm} \quad (4.14)$$

où  $C_0$  est la concentration initiale des ions et  $C_{\pm\pm}$ , la concentration effective d'ions dissociés.

En substituant 4.13 et 4.14 dans 4.10 on obtient:

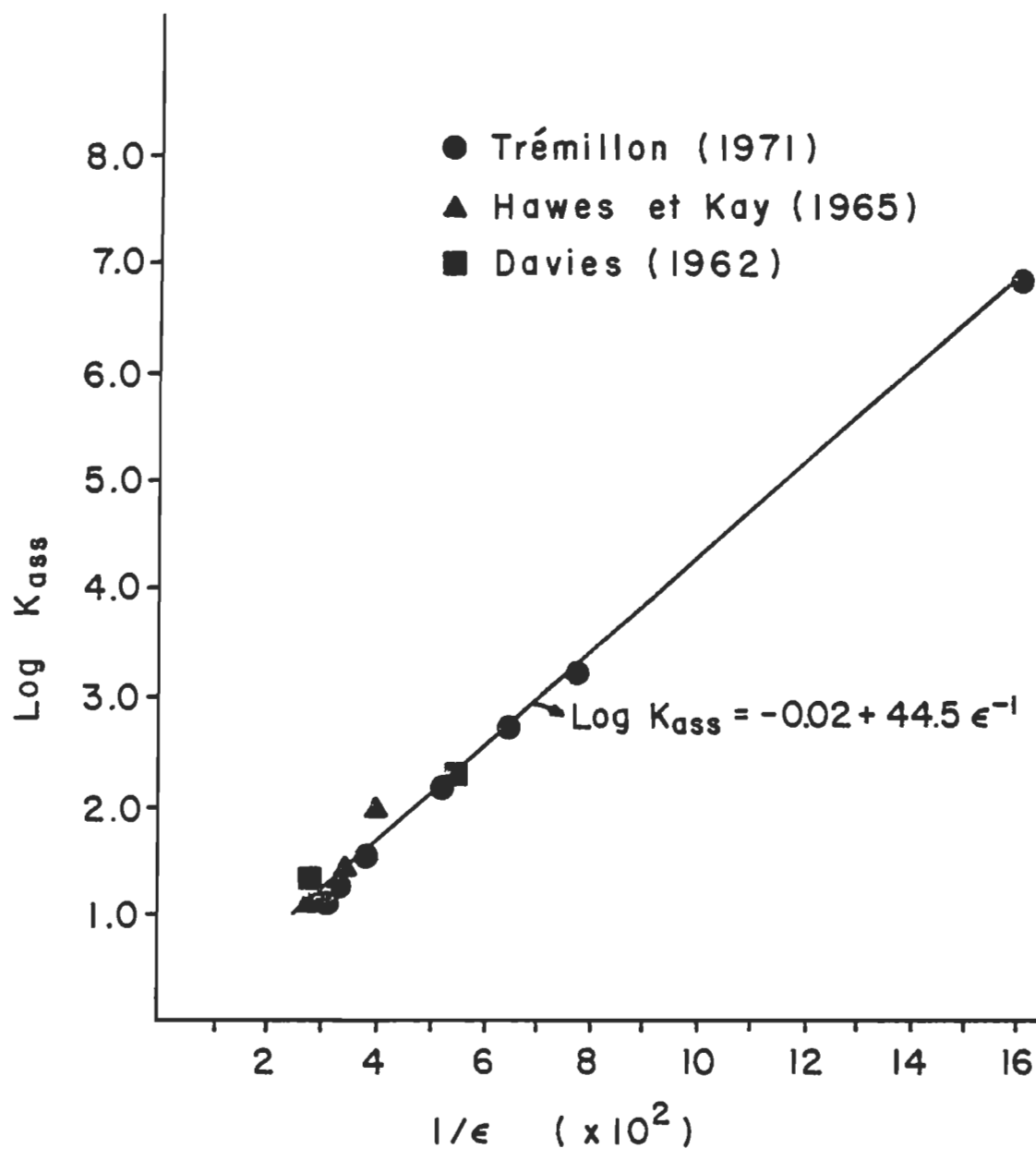


Figure 18. Variation de  $\log K_{\text{ass}}$  en fonction de  $1/\epsilon$ .

$$K_{\text{ass}} = \frac{C_0 - C_{\text{eff}}}{(C_{\text{eff}})^2} \quad (4.15)$$

ainsi

$$K_{\text{ass}} \times (C_{\text{eff}})^2 = C_0 - C_{\text{eff}} \quad (4.16)$$

et alors:

$$K_{\text{ass}} \times (C_{\text{eff}})^2 + C_{\text{eff}} - C_0 = 0 \quad (4.17)$$

Cette équation est de type quadratique dont une des solutions est:

$$C_{\text{eff}} = \frac{1 + (1 + 4 K_{\text{ass}} C_0)^{1/2}}{2 K_{\text{ass}}} \quad (4.18)$$

Il est possible à partir des valeurs de  $K_{\text{ass}}$  de la figure 18 et de  $C_0$  de calculer  $C_{\text{eff}}$ . A titre d'exemple, nous avons effectué ces calculs pour KCl. les résultats sont regroupés sur le tableau 6. On constate qu'une concentration de 0.5 M KCl dans un milieu de constante diélectrique de 29.1 a un degré d'association,  $\alpha$ , de 76% conduisant ainsi à une concentration effective de 0.122 M. Il est important de signaler ici que ces calculs sont valables pour tous les ions monovalents. Nous ne présentons que les calculs effectués avec le KCl afin de ne pas alourdir inutilement le texte. Nous utiliserons donc ces valeurs de  $C_{\text{eff}}$  (tableau 6) pour les calculs de densité de charges de surface car ces

concentrations correspondent à celles des charges positives présentes dans l'interface. Nous serons donc en mesure de calculer le champ électrique produit par des ions monovalents au voisinage d'une couche lipidique.

Maintenant, afin de pouvoir calculer  $C_{int}$ , il nous faut connaître le volume de l'interface. Ceci peut être fait à partir du modèle de la vésicule développé par Huang et Mason (1978). En se basant sur leur modèle, le volume interfacial,  $V_{int}$  est donné par l'équation:

$$V_{int} = \frac{4\pi}{3}(R_1^3 - R_2^3) \quad (4.19)$$

où  $R_1$  est le rayon externe de la vésicule soit  $105 \text{ \AA}$  et  $R_2$  représente la différence entre le rayon externe et l'épaisseur de la couche d'hydratation  $S_{on}$ , soit  $99 \text{ \AA}$ . Cependant nous pouvons considérer d'autres valeurs de  $R_1$  que  $105 \text{ \AA}$ , nous discuterons ce point ultérieurement. Donc, le nombre d'ions présents dans l'interface sera donné par:

$$N_i = C_{eff} \times V_{int} \times N / 1000 \quad (4.20)$$

Tableau 6

Valeurs de la concentration effective de KCl en fonction de la  
constante diélectrique de l'interface.

$[KCl]_{init}$ M	$\epsilon$	$K_{eff}$	$\alpha\%$	$[KCl]_{eff}$ M
0,025	32,8	17,2	25	0,019
0,05	32,8	17,2	36	0,032
0,1	31,8	19,0	49	0,051
0,15	30,9	20,8	57	0,064
0,2	29,8	23,4	63	0,074
0,3	29,5	24,2	69	0,093
0,4	29,8	23,4	72	0,111
0,5	29,1	25,4	76	0,122

En assumant que le nombre de molécules de PC ( $N_{pc}$ ) sur la face externe est de 1600 (Huang et Mason, 1978), on peut maintenant calculer  $C_{int}$  à partir de l'équation 4.8,  $\sigma$  à partir de l'équation 4.7 et finalement  $E$  avec l'équation 4.5. Par exemple, pour une concentration effective de KCl de 0,122 M, on obtient une densité de charges de surface de  $0,7 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  et un champ électrique de  $3,1 \times 10^8 \text{ V}/\text{cm}$ . Cette valeur de  $E$  est valable pour une couche d'hydratation des lipides de  $6 \text{ \AA}$ . Il peut toutefois être intéressant de considérer d'autres épaisseurs (voir tableau 7). Nous discuterons ultérieurement l'effet de la variation de l'épaisseur de la couche d'hydratation ainsi que celui du champ électrique sur la polarité de l'interface (voir section IV.4.3.).

#### IV.4.2. Calcul de $\sigma$ avec l'équation de Gouy-Chapman.

Comme nous l'avons dit précédemment, il est possible de calculer la densité de charges de surface par une autre équation, soit celle de Gouy-Chapman (G-C). Des descriptions détaillées de cette théorie peuvent être trouvées dans Aveyard et Haydon (1973) et Popiel (1978).

L'équation reliant la densité de charges de surface à la constante diélectrique et à la concentration ionique est:

$$\sigma_s = 2 \sigma_i \sinh \left( \frac{ze \psi_s}{2 kT} \right) \quad (4.21)$$

où

$$\sigma_i = [2 \epsilon \epsilon_0 kTC_i]^{1/2} \quad (4.22)$$

Tableau 7

Valeurs de  $\sigma$  et E calculées par la méthode de  
Altenbach et Seeling

[KCl] <sub>0,44</sub> M	$\sigma$ ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )			E (V/cm) $10^3$		
	h=6Å	h=10Å	h=15Å	h=6Å	h=10Å	h=15Å
0,019	0,12	0,20	0,34	0,42	0,67	1,2
0,051	0,33	0,54	0,92	1,2	1,9	3,3
0,074	0,48	0,77	1,33	1,8	2,9	5,1
0,122	0,79	1,25	2,20	3,1	4,9	8,5

où  $C_i$  est la concentration ionique, les autres paramètres ont la même signification que celle établie précédemment. Il est possible ici d'utiliser soit la concentration initiale,  $C_0$  ou la concentration effective,  $C_{eff}$ , pour valeur de la concentration ionique,  $C_i$ . La théorie originale employait la constante diélectrique de l'eau comme valeur pour  $\epsilon$ , mais plusieurs auteurs ont critiqué cette approximation (Wang et Bruner 1977, Popiel 1978, Aveyard et Haydon 1973). Ainsi, nous utiliserons plutôt les valeurs de constantes diélectriques déterminées dans les vésicules (figure 15) à l'aide de la réaction DPPH -  $\alpha$ t.

Nous avons effectué des calculs de densité de charges de surface à l'aide de l'équation 4.22. Les résultats figurent sur le tableau 8. Par exemple, on constate que pour des vésicules en présence de 0,5 M KCl, on obtient un  $\sigma_i$  de  $2,5 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  et un  $E$  de  $9,7 \times 10^5 \text{ V/cm}$ . Si toutefois on tient compte de la possibilité de formation de paires d'ions lorsque les ions pénètrent à l'interface en utilisant  $C_{eff}$  au lieu de  $C_0$ , on obtient un  $\sigma_i$  de  $1,24 \text{ C}/\text{cm}^2$  et un  $E$  de  $4,9 \times 10^5 \text{ V/cm}$ . Il est intéressant de noter que ces résultats s'approchent sensiblement de ceux calculés par la méthode de Altenbach et Seeling (1984).

#### IV.4.3. Effet du champ électrique sur la polarité de l'interface.

Avant d'interpréter les résultats des tableaux 7 et 8, il est bon de souligner qu'en appliquant la théorie de Gouy-Chapman (eq. 4.19) pour déterminer les densités de charges de surfaces, nous pouvons utiliser la concentration initiale,  $C_0$  ou la concentration effective  $C_{eff}$ , comme



Tableau 8

Valeurs de  $\sigma$  et E calculées par la méthode de  
Gouy-Chapman

$[KCl]_{init}$ M	$[KCl]_{eq}$ M	$\sigma$ ( $\mu C/cm^2$ )	E (V/cm) $10^5$
0,025	0,019	0,60 - 0,52	2,1 - 1,8
0,1	0,051	1,18 - 0,84	4,2 - 3,2
0,2	0,074	1,61 - 0,98	6,2 - 3,6
0,5	0,122	2,50 - 1,24	9,7 - 4,9

valeurs de  $C_i$ . Toutefois, comme nous l'avons mentionné précédemment, il nous apparaît plus réaliste de tenir compte de la formation d'ions et donc d'utiliser  $C_{\pm}$ .

D'autre part, la méthode de calcul développée par Altenbach et Seelig (1984) va dépendre du choix que l'on fait pour l'épaisseur de la couche d'hydratation  $S_{oh}$ . La valeur de  $6\text{\AA}$  que nous avons utilisée initialement pour les calculs est basée sur le modèle de Huang et Mason (1978) pour un rayon minimale de  $105\text{\AA}$  habituellement utilisée dans la littérature. Cependant, on peut choisir d'autres valeurs de  $S_{oh}$  tel que  $10\text{\AA}$  en assumant que le rayon externe de la vésicule est de  $109\text{\AA}$  (Chrzeszczyk et al. 1977). Finalement, nous avons calculé  $\sigma$  et  $E$  en utilisant une valeur  $S_{oh}$  de  $15\text{\AA}$ .

Nous avons effectué tous ces calculs pour le KCl seulement, soit l'ion qui cause l'effet le plus prononcé. Cependant, nous avons vérifié que les calculs avec le LiCl et le NaCl n'affectent en rien l'interprétation de nos résultats. Le tableau 8 nous donne les valeurs de  $\sigma$  et  $E$  pour des concentrations effectives de KCl qui varient de  $0,019\text{ M}$  à  $0,122\text{ M}$ . Les valeurs de champ électrique s'étendent de  $1,8 \times 10^5$  à  $4,9 \times 10^5\text{ V/cm}$ . Il est à remarquer toutefois que ces résultats ne sont pas comparables aux valeurs de  $E$  calculées par la méthode de Altenbach et Seelig (1984) pour une épaisseur de  $S_{oh}$  de  $6\text{\AA}$ . Ceci amène la question intéressante de la validité du rayon  $105\text{\AA}$  de Huang et Mason (1978). Une comparaison des données obtenues par la théorie de Gouy-Chapman et celle de Altenbach et Seelig (1984) est toutefois possible si on tient compte de l'effet de la force ionique sur  $S_{oh}$ , que l'on peut relier à l'épaisseur de la double

couche ionique  $d = 1/\kappa$  où  $\kappa$  est le paramètre de Debye-Huckel (voir e.g. Aveyard et Haydon 1973). On constate par exemple que les intensités de champ électrique obtenues par l'équation 4.19 à  $C_{\text{NaCl}} = 0,019 \text{ M}$  et à  $0,15 \text{ M}$  soit  $1,8 \times 10^5$  et  $3,2 \times 10^5 \text{ V/cm}$  sont comparables aux valeurs de  $E$  obtenues par la méthode de Altenbach et Seelig (1984) pour  $S_{\text{on}} = 15\text{\AA}$  soit  $1,2 \times 10^5$  et  $3,3 \times 10^5 \text{ V/cm}$ . De la même manière nous obtenons  $E = 3,6 \times 10^5$  et  $4,9 \times 10^5 \text{ V/cm}$  par la théorie de Gouy-Chapman pour  $C_{\text{NaCl}} = 0,074$  et  $0,122 \text{ M}$ , ce qui correspond assez bien aux valeurs de  $2,9 \times 10^5$  et  $4,9 \times 10^5 \text{ V/cm}$  obtenues par l'autre méthode avec  $S_{\text{on}} = 10\text{\AA}$ . Ceci nous indique donc que la taille des vésicules est sensible aux variations de concentrations ioniques. Il est à noter que ces conclusions sont comparables à celles obtenues par Söderman et al. (1983) sur l'effet des ions monovalents sur les couches aqueuses des bicouches lipidiques formées avec diverses phosphatidylcholine.

Ainsi, afin d'évaluer l'étendue de la saturation diélectrique sur les couches bilipidiques, nous avons utilisé le rapport de l'énergie électrostatique à l'énergie thermique,  $R_{\text{ds}}$ .

$$R_{\text{ds}} = \frac{pE}{kT} \quad (4.23)$$

où  $p$  est le moment dipolaire de l'état de transition de la réaction DPPH -  $\alpha$  t, les autres paramètres ayant été définis précédemment. La saturation diélectrique est observée pour des valeurs de  $R_{\text{ds}} > 1$  (Wang et Bruner 1978). Evidemment, l'application de l'éq. 4.20 nécessite la connaissance

de  $p$ . Une estimation raisonnable de ce paramètre serait d'environ 6 Debye ou  $9,6 \times 10^{-29}$  Cm (Turkevich et Selwood 1941) correspondant à une longueur de dipôle de  $1,2\text{\AA}$ . Ainsi, pour  $E = 4,9 \times 10^8$  V/cm, l'équation 4.20 à 295°K ( $C_{\text{Na}^+} = 0,122$  M), nous donne une valeur de  $R_{\text{d}}$  de 1,15, ce qui suggère la possibilité de saturation diélectrique. Toutefois, si cet effet fonctionne aux interfaces à des  $C_{\text{Na}^+} < 0,122$  M, il faut que  $p$  soit plus grand que 6 Debye ou que  $\epsilon$  de l'interface soit plus petit que les valeurs citées sur la figure 15. Si tel est le cas, on pourrait utiliser l'équation 4.6 au lieu de l'équation 4.5 pour calculer  $E$  (en supposant  $\epsilon = 1$ ). Les calculs indiquent alors que la saturation diélectrique serait possible pour des  $C_{\text{Na}^+} < 0,019$  M, ce qui nous semble erroné. Cependant, si un effet "Salting Out" est induit par les ions monovalents, on peut s'attendre à des valeurs très faibles de  $\epsilon$ . Ces points restent toutefois à préciser. La figure 19 présente de façon schématique la situation à l'interface si un effet de saturation diélectrique existe.

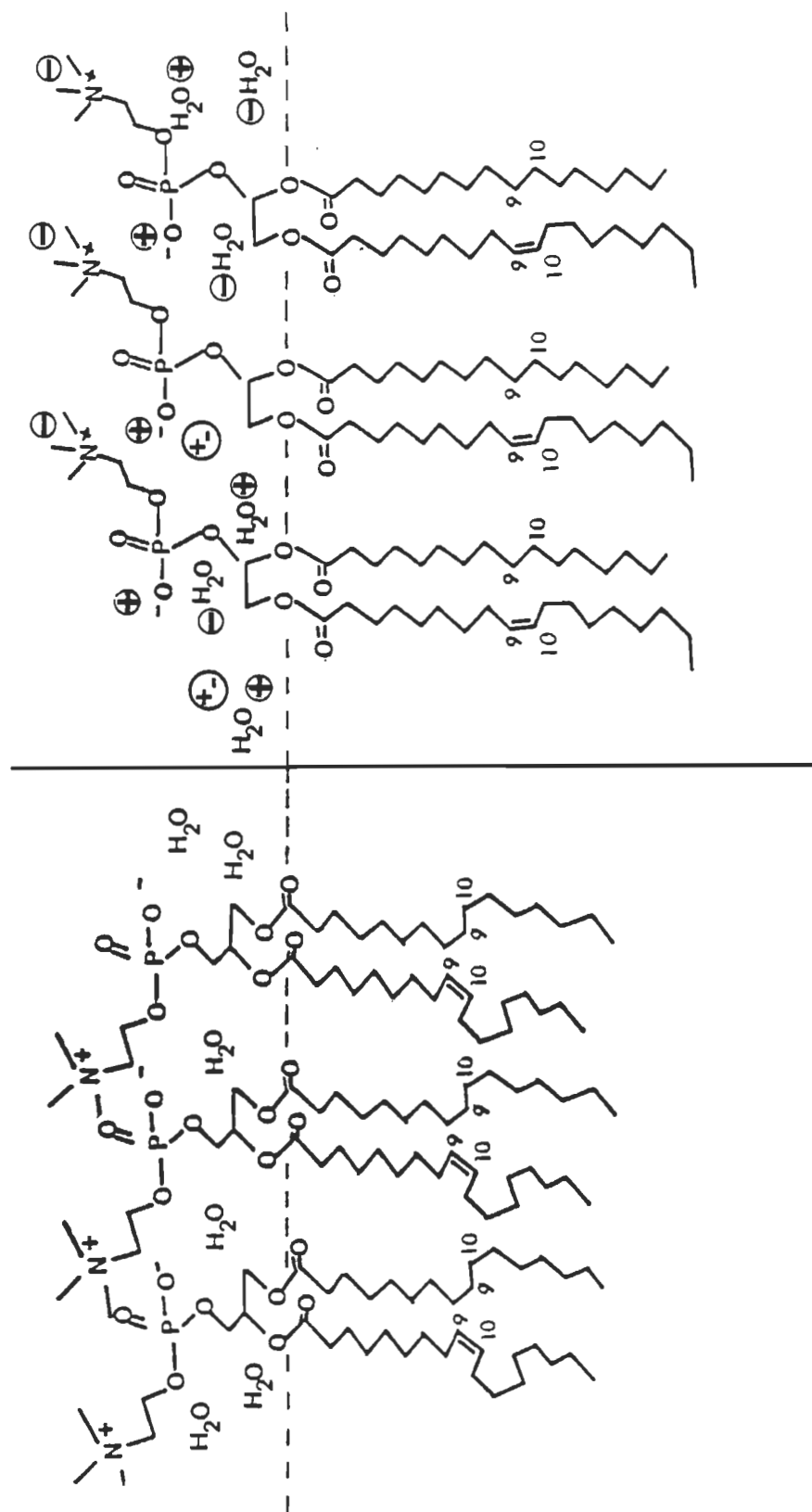


Figure 19. Hypothèse des paires d'ions: a. sans sel, b. avec sel.

#### IV.5 Effet de la taille de l'ion hydraté

Jusqu'ici, nous avons analysé les hypothèses de "Salting Out" et de saturation diélectrique afin de vérifier si l'un ou l'autre de ces modèles peut expliquer les résultats obtenus dans les vésicules. Nous avons vu que le modèle "Salting Out" peut difficilement rendre compte de la diminution de polarité de l'interface avec l'augmentation de force ionique. De plus, celui-ci ne parvient pas à expliquer l'effet de la taille de l'ion hydraté. En effet, l'ion causant la diminution la plus rapide de la constante diélectrique est le  $K^+$ . Or, il a été démontré que c'est le  $Li^+$  parmi les ions monovalents qui possèdent le plus grand pouvoir de "Salting Out" (Shaw 1970).

D'autre part, les calculs de densité de charges de surface et de champ électrique par la méthode de Altenbach et Seelig (1984) et de Gouy-Chapman suggèrent la possibilité d'un effet de saturation diélectrique. Ce modèle pourrait donc expliquer la diminution de polarité à l'interface. Cependant, ici aussi ce modèle ne permet pas de conclusion valable concernant l'effet de taille de l'ion hydraté. Nous devons donc envisager d'autres hypothèses pour expliquer les résultats de l'effet de la taille. Pour ce faire nous allons d'abord comparer nos résultats avec ceux obtenus en solution (Hasted 1973, Potter 1973, Hasted et al. 1948). Nous avons tracé sur la figure 20 la variation de la constante diélectrique d'une solution aqueuse en fonction de la concentration des ions monovalents. On constate que pour une même concentration de sel, la constante diélectrique de la solution est plus élevée avec le  $K^+$  qu'avec le  $Na^+$  ou le  $Li^+$ .

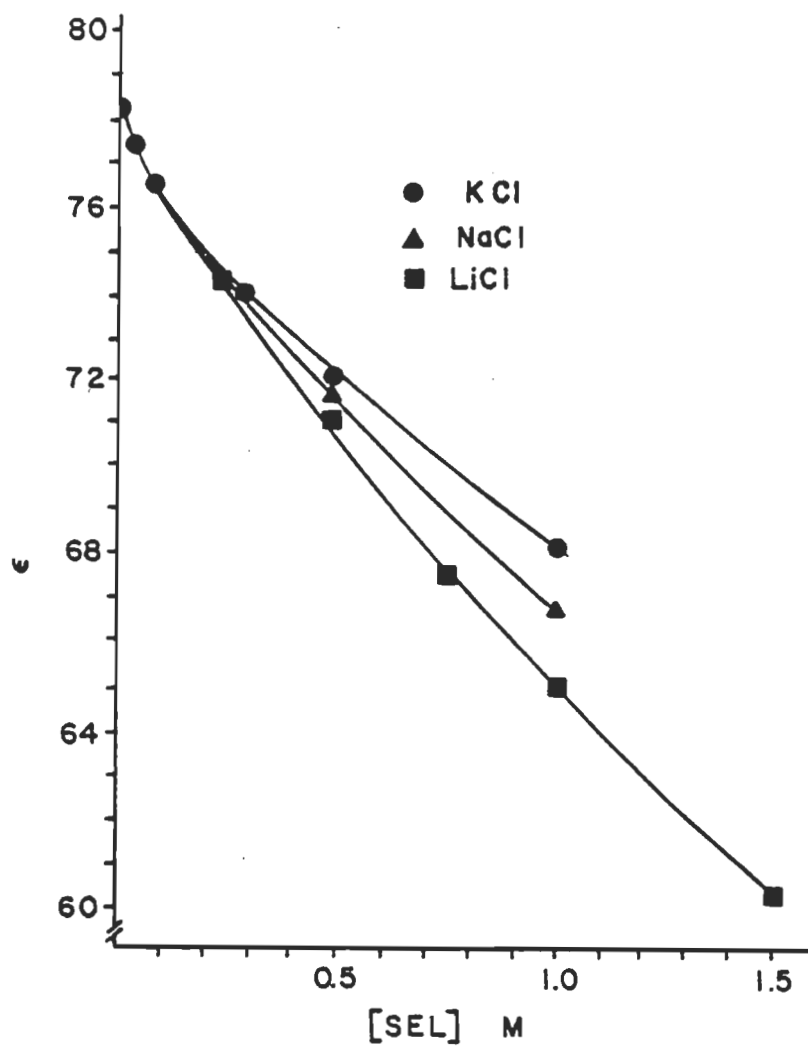


Figure 20. Variation de  $\epsilon$  en fonction de la concentration de KCl, NaCl et LiCl en solution aqueuse (d'après Hasted 1973, Potter 1973 et Hasted et al. 1948).

Ceci revient à dire que l'effet du  $\text{Li}^+$  est plus grand que celui du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$  respectivement. Or la situation inverse est observée dans les vésicules de PC-~~dt~~ (figure 15). En effet, à l'interface eau/lipide, le  $\text{K}^+$  est l'ion dont l'effet est le plus grand. Nous ne possédons aucune explication théorique de la série inverse obtenue avec les vésicules. Cependant il est possible d'envisager certaines hypothèses permettant de rendre compte de ce phénomène.

Ainsi, on peut considérer la possibilité d'une différence de perméabilité des ions dans la vésicule. Par exemple, si les vésicules de PC sont plus perméables au  $\text{K}^+$  qu'au  $\text{Li}^+$  ou  $\text{Na}^+$ , on pourrait expliquer pourquoi le  $\text{K}^+$  a un effet plus marqué sur la polarité de l'interface. En effet, une plus grande perméabilité d'un ion se traduirait par une concentration interfaciale plus élevée donc en une plus forte perturbation des molécules d'eau de cette région.

Des travaux effectués avec des liposomes formés de dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) et de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) ont montré que ces structures avaient une perméabilité sélective aux ions monovalents. A des températures voisines de la température de transition des chaînes carbonnées ( $T_c$ ), les liposomes de DLPC/DMPC sont plus perméables au  $\text{Na}^+$  et au  $\text{K}^+$  qu'au  $\text{Li}^+$  (Blok et al. 1975). D'autres études faites avec de la PC de jaunes d'oeufs (Ohki 1980) ont montré qu'il existait une légère différence de perméabilité des bicouches formées par ce lipide au  $\text{Na}^+$  et au  $\text{K}^+$ . Cette différence devient très nette lorsque l'on remplace la PC par de la phosphatidylsérine (PS). Finalement,



d'autres chercheurs (Degani et Elgavish 1978) suggèrent également que les vésicules de PC seraient plus perméables au  $\text{Na}^+$  qu'au  $\text{Li}^+$ .

Bien que nous ayons travaillé au delà de la  $T_c$  de nos lipides, on peut supposer que les vésicules conservent quand même une certaine sélectivité aux ions. De cette façon, il est possible que le  $\text{K}^+$  soit plus soluble que le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{Li}^+$  respectivement et puisse causer pour une même concentration une plus forte diminution de  $\epsilon$ . En se basant sur l'équation 4.7, il est aisé de constater qu'une valeur plus élevée de  $C_{int}$  conduit à une densité de charges de surface plus importante impliquant que l'intensité du champ électrique au voisinage de la surface serait plus grande. Il faudrait donc ajouter à l'équation 4.7 un terme qui rendrait compte de la différence de perméabilité des ions. Toutefois, ceci ne reste qu'hypothétique et des évidences expérimentales seraient nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Une possibilité serait de faire des déterminations de constantes diélectriques de l'interface près de la température de transition des lipides. Ceci pourrait être rendu possible en utilisant de la DMPC qui a une  $T_c$  de  $23^\circ \text{C}$  (Bach et Chapman 1980) au lieu de la PC de jaunes d'oeufs, qui a une  $T_c$  de  $-15^\circ \text{C}$  (Bach et Chapman 1980). Si notre hypothèse est raisonnable, on devrait s'attendre à une plus grande différence de constante diélectrique de l'interface avec la taille de l'ion. En effet, la perméabilité des vésicules est maximale au voisinage de la température de transition des chaînes (Blok et al. 1975). Il est évident que des études plus détaillées sur la sélectivité des liposomes aux ions s'avéreraient fort utiles pour élucider cet effet de taille des ions hydratés.

#### IV.6. Discussion.

Nous avons analysé au cours de ce chapitre deux hypothèses susceptibles d'expliquer nos résultats. Une première, le "Salting Out", qui consiste en une déshydratation de la concentration ionique et une autre, la saturation diélectrique qui implique une réorientation des dipôles des molécules d'eau. Nous avons constaté que ces deux hypothèses permettent d'expliquer la diminution de polarité à l'interface mais ne peuvent rendre compte de l'effet de la taille de l'ion hydraté.

Il nous a donc fallu sur ce dernier point amener d'autres explications pour interpréter ce phénomène. Dans un premier temps, on a constaté que l'effet de la taille est inversé par rapport à la situation observée dans les solutions aqueuses. Ceci nous amène à suggérer une différence de perméabilité des ions à l'interface eau/lipide. On peut supposer que la vésicule serait plus perméable au  $K^+$  qu'au  $Na^+$  et qu'au  $Li^+$  respectivement. Cette hypothèse reçoit d'ailleurs des appuis de la littérature (Ohki 1980, Degani et Elgavish 1978).

Il est donc intéressant de constater une différence de comportement entre un milieu homogène (solution) et un milieu hétérogène (une interface). Il est à noter que des différences avaient aussi été observées en ce qui a trait à la réaction DPPH- $\alpha$  en solution par rapport à la même réaction à l'interface (voir section III.4.).

## CHAPITRE V: CONCLUSION GENERALE.

Nos résultats indiquent que les ions monovalents modifient la constante diélectrique ( $\epsilon$ ) de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées des vésicules de PC. La constante diélectrique de l'interface diminue lorsque la concentration augmente mais elle diminue également lorsque la taille de l'ion hydraté diminue. Comme nous l'avons mentionné, ce résultat va à l'inverse de la situation observée en solution aqueuse (Hasted et al. 1948).

Pour expliquer l'effet de la concentration des ions monovalents sur la polarité de l'interface, nous avons analysé deux hypothèses, soit l'effet de "Salting Out" et l'effet de Saturation diélectrique. Cette dernière hypothèse pouvait rendre compte de la diminution de la constante diélectrique en fonction de la concentration en ions monovalents, mais était inefficace pour expliquer l'effet de la taille de l'ion hydraté. Ceci nous a donc amené à envisager la possibilité de perméabilité sélective des vésicules de PC aux ions monovalents. Ainsi on peut supposer que les vésicules de PC seraient plus perméables au  $K^+$  qu'au  $Na^+$  et au  $Li^+$ . Cette hypothèse reçoit quelques appuis de la littérature (Ohki 1980, Blok et al. 1975).

Les modifications de constante diélectrique causées par les ions monovalents pourraient avoir d'importantes conséquences au niveau biologique. Nous avons vu, lors de l'introduction de ce travail que la constante diélectrique joue un rôle important sur le rendement des

réactions de transfert d'électrons. Il serait ainsi possible qu'en modifiant la force ionique d'un milieu on puisse affecter les réactions de transfert d'électrons suite aux variations de constante diélectrique causées par les ions. Nous sommes conscients cependant que la situation dans les membranes naturelles est beaucoup plus complexe que dans les vésicules de PC- $\alpha$ t utilisées pour les fins de cette étude. Par exemple, dans les systèmes naturels, les protéines, les pigments et les ions divalents vont également influencer la polarité de leur milieu. Toutefois, le modèle que nous avons élaboré pourrait servir à étudier le rôle de ces molécules sur la polarité de l'interface eau/lipide. En effet, on peut incorporer certaines protéines ou pigments dans les vésicules et vérifier ensuite comment la réaction DPPH- $\alpha$ t est modifiée par la présence de ces molécules. De telles études permettront sûrement une meilleure compréhension du comportement des systèmes membranaires naturels.

REFERENCE

- Afzal, S., Tesler, W.J., Blessing, S.K., Collins, J.M. & Lis, L.J. Hydratation force between phosphatidylcholine surfaces in aqueous electrolyte solutions. J. Colloid Interface Sci., 1984, 97, 303-307.
- Akutsu, H. & Seelig, J. Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes. Biochemistry, 1981, 20, 7366-7373.
- Altenback, C. & Seelig, J.  $\text{Ca}^{2+}$  binding to phosphatidylcholine bilayers as studies by deuterium resonance. Evidence for the formation of a  $\text{Ca}^{2+}$  complex with two phospholipids molecules. Biochemistry, 1984, 23, 3913-3920.
- Ascroft, R.G., Coster, H.L. & Smith, J.R. The molecular organisation of biomolecular lipid membranes. The dielectric structure of the hydrophilic hydrophobic interface. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 643, 191-204.
- Ascroft, R.G., Thulburn, K.R., Smith, J.R., Coster, H.G.L. & Sawyer, W.H. Pertubations to lipid bilayers by spectroscopic probes as determined by dielectric measurements. Biochim. Biophys. Acta., 1980, 602, 299-308.

- Aveyard, R. & Haydon, D.A. In An introduction to the principles of surface chemistry, Cambridge: Cambridge University Press, 1973.
- Bach, D. & Chapman, D. Colorimetric studies of biomembranes and their molecular components. In A.E. Beezer (Ed.), Biological microcalorimetry. London, Academic Press, 1980, pp. 275-309.
- Ballard, S.G. & Mauzerall, D.C. Photochemical ionogenesis in solutions of zinc octaethyl porphyrins. J. Chem. Phys., 1980, 72, 933-947.
- Bellemare, F. & Fragata, M. Polarity studies of the head group of single layered phosphatidylcholine- $\alpha$ -tocopherol vesicles. J. Colloid interface Sci., 1980, 77, 243-252.
- Bellemare, F. & Fragata, M. Transmembranes distribution of  $\alpha$ -tocopherol single lamellar mixed lipid vesicles. J. membrane Biol., 1981, 58, 67-74.
- Beunen, J.A. & Rukenstein, E. The effect of Salting Out and micellization on interface tension. Adv. Colloid interface Sci., 1982, 16, 201-231.
- Block, M.C., Van Der Neut-Kuk, E.C.M., Van Deener, L.L.M. & De Gier, J. The effect of chain length and lipid phase transition on the selection permeability properties of liposomes. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 406, 187-196.

Bockris, J.O.M. & Reddy, A.K.N. In Modern electrochemistry (Vol.1).  
New-York: Plenum Press, 1972.

Boguth, W. Aspect of the action of Vitamine E. In R.C. Harris, I.G. Wood,  
J.A. Lorraine & P.L. Munson (Eds.), Vitamins and Hormones. Advances  
in Resarch and applications, New-York: Academic Press, 1969, pp.  
1-15.

Boguth, W. & Nieman U. Uber die reaktion vona-tocopherol Mit1,  
1Diphenyl-2-pikryl hydrazyl:ivDas a-tocopherylradikal. Internat.Z.  
Vit.Forschung, 1969, 39, 429-446.

Bruner, L.J. Self limited adsorption of ions onto bilayer membranes  
surfaces. In D.C. Tosteson, Y.A. Ouchinnika & R. Latorre (Eds.),  
Membrane Transport Processes (Vol.2). New-York: Raven Press, 1979,  
pp. 91-97.

Carius W. Generation of 2-nd harmonic due to dielectric saturation at  
modified lipid bilayers. Dipicrylamine in lecithin membranes. Ber.  
BunsengesPhy. Chem., 1979, 83, 905-911.

Chrzeszczyk, A., Wishnia, A. & Springer, C.S. The intrinsic structural  
asymetry of highly curved phospholipid bilayer membranes. Biochim.  
Biophys. Acta, 1977, 470, 161-169.

Cohn, E.J. Influence of the dielectric constant in biochemical systems. chem.Rev., 1936, 19, 241-273.

Cotton, F.A. & Wilkinson, G. In Advanced inorganic chemistry. A comprehensive text. New-York, 1980.

Cushlex, R.J. & Forrest, B.J. Structure and stability of Vitamin E-lecithin and phytonic acid-lecithin bilayers studies by  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance. Can.J.Chem., 1977, 55, 220-226.

Davis, C.W. In Ion association. London: Butterworths, 1962.

Daganish H & Elgavish, G.A. Ionic permeabilities of membranes.  $^{23}\text{Na}$  and  $^7\text{Li}$  NMR studies of ion transport across the membrane of phosphatidylcholine vesicles. Febs letters, 1978, 90, 357-360.

Desnoyers, J.E. & Jolicoeur, C. Hydradation effects and thermodynamic properties of ions. In J.O.M. Bockris & B.E. Conway (Eds.), Modern aspects of electrochemistry (Vo.5), 1969, pp. 189.

Dilger, J. & McLaughlin, S. Proton transport through membranes induced by weak acids: a study of two substituted benzimidazoles. J. Membrane Biol., 1979, 46, 359-384.

Dong, D.C. & Winnik, M.A. The py scale of solvent polarities, solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and



empirical correlation with E and Y values. Photochem. Photobiol., 1982, 35, 17-21.

Duniec, J.T. & Thorne, S.W. Effects of discrete charges and dielectric properties of membrane-water interface on electric potentials inside membranes. With reference to charge separation in photosynthesis. Febs letters, 1981, 126, 1-4.

Duniec, J.T. & Thorne, S.W. Electrostatic potentials in membranes systems. Bull.Math.Biol., 1983, 45, 69-90.

Edsoll, J.T. & Wyman, J. In Biophysical chemistry, New-York, Academic Press, 1958.

Eibl, H. The effect of the proton and of monovalent cations on membrane fluidity. In Membrane fluidity (Vol.2), London: Academic Press, 1983.

Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T. & McLaughlin, S. Adsorption of monovalent cations to bilayer containing negative phospholipids. Biochemistry, 1979, 18, 5213-5223.

Enderby, J.E. Neutron diffraction, isotopic substitution and the structure of aqueous solutions. Phil. Trans. R. Soc.Lond.B., 1980, 290, 553-566.

Fernandez, M.F. & Fromherz, P. Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles. J.Phys.Chem., 1977, 81, 1755-1761.

Fragata, M. & Bellemare, F. Dielectric constant dependance of biological oxydation-reduction. 1.A model of polarity dependent ferrocytochrome c oxydation. Biophys.Chem., 1982, 15, 111-119.

Fuoss, R.M. Ionic association. iii. the equilibrium between ion pairs and free ions. J.Am.Chem.Soc., 1958, 80, 5059-5061.

Gillepsie, C.J. Ion sorption and the potential profile near a model lecithin membrane. Biochim.Biophys.Acta, 1970, 203, 47-61.

Griffin, R.B., Powers, L. & Pershon, P.S. Head group conformation in phospholipids: A phosphorous-31 Nuclear Magnetic Resonance Study of oriented monodomain dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayers. Biochemistry, 1978, 17, 2718-2722.

Handbook of Chemistry and Physics (61e ed.). Cleveland, CRC Press, 1980-1981.

Hashimoto, S. & Thomas, J.K. Photophysical studies of pyrene in micellar sodium taurocholate at high salt concentrations. J.Colloid Interface Sci., 1984, 102, 152-163.

Hasted, J.B. In Aqueous dielectrics, London: Chapman Hall, 1973, pp. 136-175.

Hasted, J.B., Ritson, D.M. & Collie, C.H. Dielectric properties of aqueous ionic solutions. J.Chem.Phys., 1948, 16, 1-11.

Hauser, J.L. & Shiplex, G.G. Interactions of monovalent cations with phosphatidylserine bilayer membranes. Biochemistry, 1983, 22, 2171-2178.

Hawes, J.L. & Kay, R.L. Ionic association of potassium and cesium chlorides in ethanol-water mixtures from conductance measurements at 25°C. J.Phys.Chem., 1965, 69, 2420-2431.

Huang, C.H. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. Biochemistry, 1969, 8, 344-352.

Huang, C.H. & Mason, J.T. Geometric packing constraint in egg phosphatidylcholine vesicles. Proc.Natl.Acad.Sci., 1978, 75, 308-310.

Israelachvili, J.N. & Ninham, B.W. Intermolecular forces, the long and short of it. J. Colloid interface sci., 1977, 58, 14-25.

Iwamoto, K. & Sunamoto, J. Liposomal membranes ix. Fluorescence dipolarisation studies on N-DHDA in liposomal bilayers. Bull.Chem.Soc.Jpn., 1981, 54, 399-403.

- Johnson, S.M. The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonicated phospholipid vesicles. Biochim.Biophys.Acta., 1973, 307, 27-41.
- Kaneshina, S., Kanaya, H. & Veda, I. Benzyl alcohol penetration into micelles, dielectric constant of binding site, partition coefficient and high pressure squeeze out. Biochim.Biophys.Acta, 1984, 777, 75-83.
- Kurland, R., Newton, C. & Papahadjopoulos, P. Specificity of Na<sup>+</sup> binding to phosphatidylserine vesicles from a <sup>23</sup>Na NMR relaxation rate study. Biochim.Biophys.Acta, 1979, 551, 137-147.
- Laidler, K.J. Chemicals Kinetics (2e ed.) New-York: McGraw-Hill, 1965.
- Latham, J.L. & Burgess, A.E. Elementary reaction kinetics, (3e ed.) London: Butterworths, 1977.
- Laver, D.R., Smith, J.R. & Coster, H.G.L. the thickness of the hydrophobic and polar regions of glycerol monooleate bilayers determined from the frequency dependance of bilayer capacitance. Biochim.Biophys.Acta, 1984, 772, 1-10.
- Lianos, P. & Zana, R. Use of pyrene excimer formation to study the effect to sodium chloride on the structure of Dodecyl Sulfate Micelles.

J.Phys.Chem., 1980, 84, 3339-3341.

Lis, L.J., Kauffman, J.W. & Shriver, D.F. Effects of ions on phospholipid layer structure as indicated by Raman spectroscopy. Biochim.Biophys.Acta., 1975, 406, 453-464.

Lis, L.J., McAlister, M., Fuller, N., Rand, R.P. & Parsegian, U.A. Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. Biophys.J., 1982, 37, 657-666.

Loosly-Millan, M.E., Rand, R.P. & Parsegian, U.A. Effects of monovalent ion binding and screening on measured electrostatic forces between charged phospholipid bilayers. Biophys.J., 1982, 40, 221-232.

Losev, A. & Mauzerall, D. Photoelectron transfert between charged derivative of chlorophyll and ferricyanide at the lipid bilayer-water interface. Photochem.Photobiol., 1983, 38, 355-361.

Mazer, N.A., Benedek, G.B. & Carey, M.C. An investigation of the micellar phase of sodium dodecylsulfate in aqueous chloride solution using quasielastic light scattering spectroscopy. J.Phys.Chem., 1976, 80, 1075-1084.

McLaughlin, A., Grathwohl, C. & McLaughlin, S. The adsorption of divalent cations to phosphatidylcholine membranes. Biochim.Biophys.Acta., 1978, 513, 338-357.

- Mironou, S.L. The effect of the dielectric constant of protein on the ionic transport process in biomembranes. Bioelectrochem.Bioenerg., 1983, 10, 345-356.
- Misra,D.N. Rate studies of the reaction of 1,1-diphenyl-2-pi-crylhydrazyl microcrystallites with adsorbed water on e rutile surface. Tetrahedron, 1970, 26, 5447-5452.
- Monoi, H. Possible existence of ions pairs at the mouth of ion channels. Biochim.Biophys.Acta, 1982, 693, 154-164.
- Neilson, G.W. & Enderby, J.E. Neutron and X-Ray diffraction studies of concentrated aqueous electrolyte solutions. Ann.Rep.Prog.Chem.C.Phys.Chem., 1980, 76, 185-220.
- Nir, S., Newton, C. & Papahadjopoulos, P. Binding of cations to phosphatidylserine vesicles. Bioelectrochem.Bioenerg., 1978, 5, 116-133.
- Ohki, S. Membrane potential and ion permeability of lipid bilayer membranes. Bioelectrochem.Bioenerg., 1980, 7, 487-501.
- Onsager,L. Electric moments of molecules in liquids. J.Am.Chem.Sco., 1936, 58, 1486-1493.

Parsegian, U.A., Fuller, N. & Rand, R.P. Measured work of deformation and repulsion of lecithin bilayers. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1979, 76, 2750, 2754.

Poirier, J.C. Thermodynamic functions from maycr's theory of ion solns (I) equation for ther modynamic functions (II) stoichimet mean ionic molar activity coeff. J.Org.Chem., 1952, 30, 550-555.

Popiel, W.J. In Introduction to colloid science, New-York: Exposition Press, 1978, p. 217.

Pottel, R. the complex dielectric constant some aqueous electrolyte solutions in an acid frequency range. In B.E. Conway & R.G. Barradas (Eds.) Chemical physics of ionic solutions. New-York: John Wigy and Sons, 1966, Ch. 25, pp. 581-598.

Pottel, R. In F. Frank (Ed.), Dielectric properties in water a comprehensive treatise (Vol. 3). New-York: Plenum Press, 1973, pp. 401-455.

Pryor, W.A. the role of free radical reaction in biological systems. In W.A. Pryor (Ed.) Free radicals in Biology (Vol. 11). New-York: Academy Press, 1976, pp. 1-49.

Ptak, M., Egret-Chorlier, M., Samson, A. & Bouloussa, O. A NMR study of

the ionisation of fatty acids, fatty amines, and N-acrylamino acids incorporated in phosphatidylcholine vesicles. Biochim.Biophys.Acta., 1980, 600, 387-397.

Puski, J. & Coene M.T.  $\text{Na}^+$  and  $\text{H}^+$  dependant  $\text{Mn}^{2+}$  binding to phosphatidylserine vesicles as a test for the Gouy-Chapman theory. J.Membrane Biol., 1980, 52, 69-74.

Rees, D.C. Experimental evaluation of the effective dielectric constant of protein. J.Mol.Biol., 1980, 141, 323-326.

Riston, D.M. & Hasted, J.B. Dielectric properties of aqueous ionic solution., Part ii. J.Chem.Phys., 1948, 16, 11-21.

Simon, S.A., Lis, J.L., Kauffman, J.W. & Mac Donald, R.C. A calorimetric and monolayer investigation of the influence of ions on the thermodynamics properties of phosphatidylcholine. Biochim.Biophys.Acta., 1975, 375, 317-326.

Singleton, W.S., Gray, M.J., Brown, M.L. & White, J.L. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. J.Am.Oil.Chem.Soc., 1965, 42, 53-69.

Shaw, D.J. Introduction to colloid and surface chemistry. London: Butterworths, 1970, p. 36.



Iderman, O., Arvidson, G., Linblom, G. & Fontell, K. The interaction between monovalent ions and phosphatidylcholine in aqueous bilayers. Eur.J.Biochem., 1983, 134, 309-314.

Iyastavu, S., Phadke, R.S., Govil, G. & Rao, C.N.R. Fluidity, permeability and antioxydant behaviour of model membranes incorporated with  $\alpha$ -tocopherol and vitamin E acetate. Biochim.Biophys.Acta., 1983, 734, 353-362.

Iwamoto, J., Baba, Y. Iwamoto, K. & Karlo, H. Liposomal membranes. xx. Auto-oxydation of unsaturated fatty acids in liposomal membranes. Biochim.Biophys.Acta., 1985, 833, 144-150.

Jädlér, R. Role of phospholipid head group structure and polarity in the control of membrane fusion. In M. Kales & A. Masson (Eds.), Membrane fluidity (Vol. 9). New-York: Plenum Press, 1984, pp. 563-583.

Kilford, C., The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, 2e ed., Wiley Interscience, New-York, 1980.

Kinoshita, J.K. Radiation-induced reactions in organized assemblies. Chem.Rev., 1980, 80, 283-299.

Kruger, J. In The physico-chemical constant of binary systems in concentrated solutions (Vol. 4), New-York: Interscience, 1980, pp. 201-202.

Träuble, H., Teubner, M., Wooley, P. & Eible, H. Electrostatic interactions at charged lipid membrane structure. Biophys. Chem., 1976, 4, 319-342.

Tremillon, B. In La chimie en solvants non-aqueux. Paris: Presse Universitaires de France, 1971.

Veernan, E.C.I., Van Leeuwenn, J.W., Van Beurenk, J.H. & Van Gelber, B.F. The reaction of cytochrome aa<sub>3</sub> with cytochromec as studied by pulse radiolysis. Biochim.Biophys.Acta., 1982, 680, 134-141.

Wang, C.C. & Bruner, L.J. Dielectric saturation of the aqueous boundary layers adjacent to charged bilayers membranes. J.Membr.Biol., 1978, 38, 311-331.